

DIE ONTOGENESE
DER OSMOTISCHEN VERDÜNNUNGSFÄHIGKEIT
DER HENLESCHEN SCHLEIFE

Mikropunktionsuntersuchungen an der Rattenniere

Hans Zink

—
1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof.Dr.med. K. Thureau
Prof.Dr.med. E. Gerlach
Prof.Dr.med. G. ten Bruggencate

Die Ontogenese der osmotischen Verdünnungsfähigkeit
der Henleschen Schleife.

Mikropunktionsuntersuchungen an der Rattenniere.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Zink

aus

Straubing/Niederbayern

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. M. Horster

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. K. Thureau

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.4.1981



Meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Grundlegende Befunde zur postnatalen Entwicklung der osmotischen Konzentrierung des Endharns	1
2. Methodik	8
2.1 Untersuchungsmaterial	8
2.2 Präparation und Lagerung der Niere für die Mikropunktionsanalyse	8
2.3 Analyse einzelner Nephronen durch Mikropunktion	11
2.3.1 Identifizierung der Nephronsegmente zur Mikropunktion	12
2.3.2 Messung des hydrostatischen Drucks im Tubuluslumen	12
2.3.3 Lineare Strömungsgeschwindigkeit durch die Henlesche Schleife	12
2.3.4 Auswahl der Nephronen zur Probenentnahme	13
2.3.5 Entnahme von Flüssigkeit aus einzelnen Tubuli	13
2.3.6 Fehlermöglichkeiten bei der Probenentnahme	15
2.3.7 Identifizierung der Nephronsegmente zur Mikrodissektion	16
2.4 Mikrodissektion einzelner Nephronsegmente	16
2.5 Analyseverfahren	17
2.5.1 Analyse des Endharns und des Serums	17
2.5.2 Analyse der Tubulusflüssigkeiten	17
2.5.2.1 Volumenmessung	17
2.5.2.2 Bestimmung der Inulinkonzentration in der Tubulusflüssigkeit	17
2.5.2.3 Bestimmung der osmotischen Konzentrationen in der Tubulusflüssigkeit	19
2.6 Auswertung	19

	Seite
3.	Ergebnisse 21
3.1	Beschreibung des Versuchsprotokolls 21
3.2	Funktion der Gesamtniere 24
3.2.1	Glomeruläre Filtrationsrate 24
3.2.2	Resorption des tubulären Natriumloads 24
3.2.3	Resorption des tubulären Volumenloads 26
3.3	Funktionsentwicklung des Nephrons 26
3.3.1	Glomeruläre Filtrationsrate des Nephrons 26
3.3.2	Volumenresorption im proximalen Tubulus 30
3.3.3	Volumenresorption in der Henleschen Schleife 33
3.3.4	Intratubulärer hydrostatischer Druck im proximalen und distalen Tubulus 33
3.3.5	Intratubulärer osmotischer Druck im distalen Tubulus 33
4.	Diskussion 38
4.1	Entwicklung der Nierenfunktion als Summe von Einzelfunktionen 38
4.2	Entwicklung der Nierenfunktion als Differenzierung des Einzelnephrons 38
4.2.1	Glomerulumfiltrat des Einzelnephrons 38
4.2.2	Volumenresorption in der Henleschen Schleife während der frühen postnatalen Entwicklung 41
4.2.3	Osmotische Verdünnungsfähigkeit der Henleschen Schleife 43
5.	Zusammenfassung 47
6.	Literatur 49

1. Grundlegende Befunde zur postnatalen Entwicklung der osmotischen Konzentrierung des Endharns

Die Niere des Säugetiers durchläuft während des frühen postnatalen Wachstums einen Entwicklungsprozeß sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihrer Funktion.

Messungen der osmotischen Aktivität des Endharns verschiedener Säugetierspezies, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Antidiurese befinden, zeigen, daß neugeborene Tiere einen Harn mit signifikant niedrigerer Teilchenkonzentration ausscheiden, als erwachsene Tiere derselben Art (2, 5, 17, 18, 20, 22, 27, 32).

Untersucht man dieselben Tiere nach Dehydrierung, so findet man bei den reifen Tieren eine wesentlich erhöhte Endharnosmolarität. Neugeborene hingegen sind nicht in der Lage, unter den gleichen Bedingungen die osmotische Konzentration des Endharns zu erhöhen. Erst nach Abschluß der Differenzierung der Niere sind sie befähigt, einen Harn mit der maximal erreichbaren osmotischen Konzentration zu bilden. Für die Ratte scheint dies nach dem 21. Lebenstag möglich zu sein (27, 69). Die osmotische Aktivität des Endharns beträgt dabei 1600 mosmol/l.

Bei Tieren unter chronischer Kochsalzbelastung sind, wie in der vorliegenden Arbeit gemessen, dieselben Effekte zu beobachten (70, 71). Auch hier steigt die Endharnosmolarität in Antidiurese mit zunehmendem Alter bzw. Nierengewicht an (Abb. 1).

Funktionelle Veränderungen der Niere während der postnatalen Differenzierung zeigen sich somit auch in einer Zunahme der maximalen osmotischen Endharnkonzentrierung, d.h. in einer erhöhten Resorption des filtrierte Volumens.

Einer akuten Veränderung im Wasserhaushalt, wie sie zum Beispiel durch eine verminderte Volumenzufuhr hervorgerufen wird, kann die Niere des erwachsenen Organismus wesentlich wirkungsvoller begegnen, da sie in der Lage ist, mehrfach hypertonen Urin zu

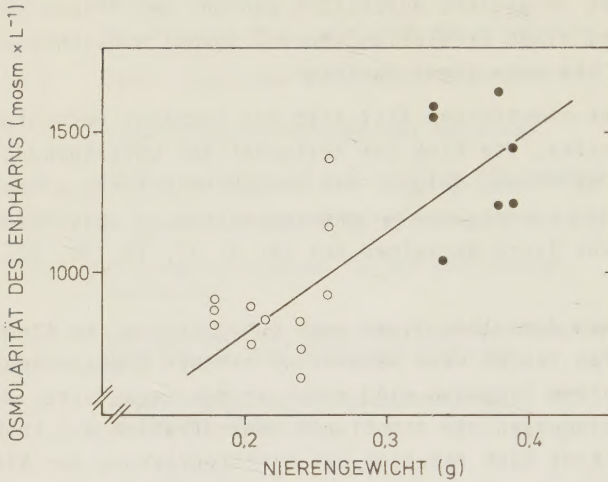


Abb. 1: Beziehung von Nierengewicht und Osmolarität des Endharns während der postnatalen Entwicklung der Ratteniere.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (12 - 15 Tage)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (27 - 35 Tage)

Mittelwerte: Nierengewicht Osmolarität des Endharns

Gruppe I 0.23 ± 0.03 (g) 857.69 ± 224 (mosmol/l)

Gruppe II 0.36 ± 0.03 (g) 1389.28 ± 226 (mosmol/l)

Regression: $y = 95.2 x + 3490.98$

bilden. Nieren, die sich im Anfangsstadium ihrer postnatalen Differenzierung befinden, erhöhen in der gleichen Situation ihre Endharnosmolarität nur wenig, als Ausdruck einer niedrigeren Wasserrückresorption im distalen Nephron. In dieser Phase der Entwicklung ist somit die osmotische extrazelluläre Regulation eingeschränkt.

Die Reifung der Nierenfunktion beginnt jedoch bereits pränatal, wie beim Schaf und Meerschweinchen untersucht wurde (1, 3, 4, 8, 10).

Das Glomerulumfiltrat, bezogen auf das Körpergewicht, beträgt etwa ein Viertel des Filtrats erwachsener Tiere. Die foetale Niere bildet bereits wenige Tage vor der Geburt hypertonen Urin und resorbiert etwa 90% ihres Glomerulumfiltrats. Dennoch wird die Homöostase des foetalen Organismus zum größten Teil durch die Funktionen von Plazenta und mütterlichen Nieren eingestellt (33). Von der foetalen Niere wird somit keine große Regulationsbreite gefordert, da der extrazelluläre Raum des Foeten mit dem vielfach größeren Extrazellulärraum der Mutter im Austausch steht. Veränderungen seiner Zusammensetzung werden durch Diffusionsvorgänge ausgeglichen, bis mit der Geburt abrupt diese "plazentare, extrakorporale Hämodialyse" entfällt.

Im Gegensatz dazu verläuft die Differenzierung der renalen Mikroarchitektur kontinuierlich. Ihr hervorragendes Merkmal ist die zentrifugale Reifung (21, 47, 62). Dies bedeutet, daß Nephrene in äußeren Schichten der Nierenrinde einen niedrigeren Differenzierungsgrad als die der inneren Rindenschichten aufweisen. In Nieren neugeborener Ratten (2 - 5 Tage nach der Geburt) finden sich in der obersten Rindenschicht noch frühe Entwicklungsstufen des späteren Nephrons: Embryonale, mesenchymale, tubuläre Anlagen sowie epitheliale Strukturen des Nierenbeckens (49).

Die epithelialen frühen Sammelrohre induzieren beim Anschluß an ihren mesenchymalen Anteil diesen zur Differenzierung in das spätere Nephron. In den inneren Rindenschichten hingegen finden

sich perinatal bereits morphologisch differenzierte Nephrone, in denen glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion direkt nachgewiesen wurden (23, 50, 51). Für die vorliegende Arbeit ist die mikroarchitektonische Differenzierung der Henleschen Schleife von Bedeutung. Diese verläuft dergestalt, daß die Schleifenlängen insbesondere der Nephrone äußerer Rindenschichten zunehmen und dadurch von der Rinde in die Außenzone des Nierenmarks eintreten.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Nierenrinde hinsichtlich der Form des Einzelnephrons eine Zonierung in Nephrongenerationen verschiedener Entwicklungsstufen aufweist, die mit zunehmender Nähe zum Mark einen höheren Grad der Reifung erkennen lassen.

Die vorliegende Arbeit wird versuchen, die morphologische Differenzierung der Henleschen Schleifen den vielfältigen funktionellen Veränderungen innerhalb des osmotischen Konzentrierungsmechanismus zuzuordnen.

Im Nierenmark besteht ein longitudinales Profil steigender Harnstoff- und Natriumkonzentrationen von der Rinden-Markgrenze bis zur Papille. Dieses Profil ändert sich in der Entwicklung derartig, daß bei dehydrierten Ratten bis zum 30. Tag postnatal in der jeweils gleichen Schicht die Natrium- und Harnstoffkonzentrationen ansteigen und somit das Profil steiler wird (63, 69).

Dieser longitudinale medulläre Konzentrationsgradient bildet die Grundlage des Mechanismus, mit dem die Niere einen gegenüber dem Plasma mehrfach hypertonen Urin bilden kann (29, 40, 42).

Am Aufbau und der Erhaltung des medullären Konzentrationsgradienten sind verschiedene Einzelfunktionen beteiligt, deren Zusammenwirken zunächst für die reife Niere modellhaft dargestellt werden soll. Grundlage des Modells bildet der anatomische Befund, daß tubuläre und vaskuläre Strukturen des Nierenmarks jeweils in Form eines Gegenstromsystems angeordnet sind

(42). Dieser aus der Technik übernommene Begriff sagt in seiner einfachsten Form, daß zwei in engem räumlichen Kontakt zueinander stehende, parallel verlaufende Röhren in gegenläufiger Richtung von Flüssigkeit durchströmt werden.

In Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Röhrenwände und der Strömungsgeschwindigkeit kann entweder ein Konzentrationsaustausch von gelösten Stoffen, von Flüssigkeit oder Wärme zwischen beiden Röhrenschenkeln erfolgen; oder es kommt zu einer Vervielfachung verschiedener Einzeleffekte, die über die Kontaktfläche der beiden Röhren bestehen.

Die Strukturen des Nierenmarks, Henlesche Schleifen, Sammelrohre und Vasa recta sind gleichermaßen parallel von Rinden-Markgrenze bis zur Papille verlaufend angeordnet.

Untersuchungen in vivo an der freigelegten Papille der Ratteniere (26, 33) sowie in vitro an isoliert perfundierten Nephronsegmenten des Gegenstromsystems (11, 35, 36, 37, 41, 53) haben Teilfunktionen wie hydraulische Leitfähigkeiten und Permeabilitäten charakterisiert.

Zusammen mit diesen Befunden konnte folgendes Prinzip der renalen osmotischen Gegenstromkonzentrierung entwickelt werden:

Isotone Flüssigkeit tritt aus der Pars recta des proximalen Konvoluts in den absteigenden Teil der Henleschen Schleife ein. Aufgrund einer hohen Wasserleitfähigkeit und einer geringen Natriumpermeabilität in diesem Tubulusabschnitt kommt es zu einem Wasserentzug (37, 41, 48) entlang des osmotischen Gradienten zwischen intratubulärer Flüssigkeit und Interstitium und zu einem Anstieg der luminalen Natriumkonzentration. In der Innenzone des Nierenmarks stellt der Harnstoff den wesentlichen Anteil dieses osmotischen Gradienten dar.

Im aufsteigenden dünnen Teil der Henleschen Schleife, der eine geringe Wasserleitfähigkeit und eine hohe Natriumpermeabilität aufweist, kommt es zu einem Natriumausstrom, da ein Konzentrationsausgleich zwischen luminaler und interstitieller Natrium-

konzentration erfolgen kann. Im anschließenden dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife wird Natrium entgegen einem elektrochemischen Gradienten (11, 54) aus dem Tubuluslumen resorbiert. Die luminale Flüssigkeit wird hypoton, da die Wasserleitfähigkeit in diesem Nephronabschnitt sehr niedrig ist und kein osmotischer Angleich mit dem Interstitium stattfinden kann. Die Fähigkeit zur Bildung hypotoner Flüssigkeit besitzen sowohl die Henleschen Schleifen juxtamedullärer Nephronen, die tief in das Nierenmark bis zur Papille reichen, als auch die Henleschen Schleifen superfizieller Nephronen, deren Umkehrpunkte in der äußeren Markzone liegen. Im Verlauf der distal der Henleschen Schleifen gelegenen Nephronabschnitte kommt es zunächst zu einer Harnstoffkonzentrierung. Diese beruht auf einer Wasserresorption im distalen Konvolut und den corticalen Abschnitten des Sammelrohrs bei niedriger Harnstoffleitfähigkeit. Die Wasserleitfähigkeit, nicht jedoch die Harnstoffleitfähigkeit, steht unter dem Einfluß des Antidiuretischen Hormons (24, 25, 53).

Im medullären Verlauf des Sammelrohrs finden wir einen Anstieg der Harnstoffleitfähigkeit. Ein Konzentrationsangleich zwischen luminaler und interstitieller Harnstoffkonzentration kann stattfinden. Dies resultiert in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration im Sammelrohr in der Bereitstellung eines hohen osmotischen Drucks in der Innenzone des Nierenmarks und damit in einer hohen osmotischen Konzentration des Endharns.

Die Höhe der Harnstoffkonzentration im medullären Sammelrohr scheint nach diesem Modell im wesentlichen von der Bildung hypotoner Tubulusflüssigkeit durch die Henlesche Schleife abhängig zu sein. Eine geringe osmotische "Verdünnungsfähigkeit" der Henleschen Schleife hätte demnach einen geringeren osmotischen Druck im Nierenmark zur Folge, was aufgrund der oben beschriebenen Befunde mit einer verminderten maximalen osmotischen Konzentrierung des Endharns korreliert.

Die vorliegende Arbeit hatte sich zur Aufgabe gemacht zu untersuchen, ob diese Verdünnungsfähigkeit der Henleschen Schleife

einem Entwicklungsprozeß unterworfen ist. Dazu wurden die Henleschen Schleifen superfizieller Nephronen von Rattennieren mit Methoden der Mikropunktion untersucht. Da Anfang und Ende der Henleschen Schleife der direkten Punktion in situ nicht zugänglich sind, wurden in den angrenzenden Tubulusanschnitten - spätproximaler und frühdistaler Tubulus - Flüssigkeitsproben entnommen und aufgrund der hier gewonnenen Daten Aussagen über die Verdünnungsfähigkeit der Schleife getroffen.

2. Methodik

2.1 Untersuchungsmaterial

Die in der Arbeit mitgeteilten Befunde wurden an 15 Wistar-Ratten (Munich Wistar) erhoben. Die Tiere waren zwischen 12 und 35 Tagen alt. Da die Zahl der geborenen Tiere pro Wurf stark differierte, wurde die Größe des Wurfs unmittelbar nach der Geburt auf sechs Tiere reduziert. Damit sollte erreicht werden, daß alle Tiere unter möglichst gleichen Bedingungen aufwuchsen.

Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet:

- I. Tiere während der frühen postnatalen Entwicklung.
Diese Tiere waren zwischen 12 und 15 Tagen alt.
Das Nierengewicht betrug 0.18 - 0.26 g. Die Zahl der untersuchten Tiere dieser Gruppe war 11.
- II. Tiere während der späten postnatalen Entwicklung.
Die Tiere waren zwischen 27 und 35 Tage alt. Das Nierengewicht betrug 0.34 - 0.39 g. Die Anzahl der untersuchten Tiere war 4.

Die trächtigen Tiere und die Würfe wurden mit einer salzreichen Diät ernährt (0.9%ige NaCl-Lösung als Trinkwasser und Altromin-Standard-Diät).

2.2 Präparation und Lagerung der Niere für die Mikropunktionsanalyse

Die Versuche wurden an narkotisierten Tieren durchgeführt. Die Narkosemedikation bestand aus dem relativ kurzzeitig wirkenden Barbiturat Nembutal (Natrium-Pento-Barbital) und Äther. Eingeleitet wurde mit einer niedrigen intraperitonealen Dosis Nembutal (2.5 mg/100 g Körpergewicht). Die Narkose wurde bei Bedarf während der Präparation durch Äther aufrecht erhalten und vertieft. Nach Abschluß der Präparation wurde Nembutal in der Erhaltungsdosis (siehe unten)

fortlaufend über einen Jugulariskatheter infundiert. Bei dem hier beschriebenen Narkoseverfahren befanden sich die Tiere bis zu etwa drei Stunden nach Beginn der Narkose, gemessen an Kreislauf- und Nierenfunktionswerten, in gleichbleibend guter Verfassung.

Die in dieser Versuchsreihe angewandten Kriterien, die eine von Versuch zu Versuch gleichbleibende Qualität der Präparation sichern sollten, werden im nachfolgenden Abschnitt (Methodik) erläutert.

Die narkotisierten Tiere wurden zunächst in Rückenlage an den gestreckten Extremitäten auf dem Mikropunktionstisch befestigt. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern, mußten die Tiere erwärmt werden. Zu diesem Zweck war im Mikropunktionstisch eine Heizplatte eingelassen, die die rektal gemessene Körpertemperatur bei 37° C konstant hielt.

Das Tier wurde zunächst tracheotomiert und mit einem Polyäthylentubus, der für die jeweils vorliegende Tracheengröße angefertigt wurde, intubiert. Zu Beginn mußte häufig Sekret abgesaugt werden, um eine Verlegung der Atemwege zu verhindern.

Nach der Tracheotomie wurde die rechte Vena jugularis freipräpariert und mit einem passend gefertigten Polyäthylenschlauch (Durchmesser ca. 250 µ) katheterisiert. Alle Präparationen fanden unter einer Binokularlupe (10-fache Vergrößerung) statt. Der Venenkatheter war mit einem Spritzensystem verbunden, das mit einer definierten Infusionslösung gefüllt war. Die Befestigung des Katheters erfolgte durch einzweifache Ligatur. Das freiliegende Operationsgebiet wurde anschließend mit in Öl getränkter Watte bedeckt, um einen Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung zu verhindern. Das Infusat bestand zu jeweils gleichen Teilen aus Ringerlösung (Zusammensetzung: NaCl 230 mM, KCl 10 mM, NaHCO₃ 50 mM, CaCl₂ 2 mM) und einer Inulinlösung (Inutest^R Laevosan).

Es wurde über eine regulierbare Pumpe verabreicht (Perfusor; Braun-Melsungen) und war sowohl in Bezug auf die Natriumkonzentration als auch auf die Gesamtosmolarität isoton. Um während des Versuchs die Narkose aufrecht erhalten zu können, wurde wie oben bereits beschrieben zur Infusionslösung Nembutal gegeben (1.25 mg/ml Infusionslösung). Das Infusionsvolumen wurde auf 0.6 ml/Std/100 g Körpergewicht festgesetzt. Die verabreichte Inulinmenge betrug 0.075 g/Std/100 g Körpergewicht. Diese Menge reichte aus, um nach vollständiger Äquilibration eine konstante Konzentration von 100 - 130 mg/100 ml Serum zu erhalten. Das während des Experiments vom Tier renal ausgeschiedene Flüssigkeitsvolumen lag in der Regel bei Werten von 0.8 ± 0.2 ml/Std/g Nierengewicht.

Um den mittleren arteriellen Druck fortlaufend messen zu können, wurde die linke Femoralarterie unterhalb des Leistenbandes mit einem Polyäthylenschlauch (Durchmesser ca. 0.3 mm) katheterisiert. Die Spitze dieses Katheters kam dabei in der Arteria abdominalis zu liegen. Er war über einen Druckumwandler (Statham) mit einem elektronischen Blutdruckmeßgerät verbunden (Hellige).

Das Tier wurde anschließend in die rechte Seitenlage gebracht und die Niere durch einen subcostalen Schnitt freigelegt. Fettkapsel und Nebenniere wurden von der fibrösen Nierenkapsel abpräpariert und Milz und Darm durch in Öl getränkte Zellstoffstreifen vor Austrocknung geschützt.

Nachdem der Hilus freipräpariert worden war, wurde die Niere in einer Plexiglasschale fixiert und durch Mineralöl mit einer konstanten Temperatur von 38° C überspült.

Der Ureter wurde mit einer Polyäthylenkanüle katheterisiert, wobei Verletzungen der in diesem Entwicklungsalter noch weit unter dem Parenchym hervorragenden Nierenpapille dadurch vermieden wurden, daß der Ureter in größtmöglicher Entfernung vom Nierenbecken eröffnet wurde. Damit war die Präparation abgeschlossen.

Es wurde zunächst begonnen, in kleinen Polyvinylgefäßen (Eppendorf) fortlaufend Urin zu sammeln. Die Sammelperioden waren zwischen 20 und 40 Minuten lang.

In den meisten Experimenten wurden jeweils vor Beginn einer Sammelperiode Blutproben entnommen und zentrifugiert. Das auf diese Weise entnommene Volumen war nie größer als 10^{-4} L.

2.3 Analyse einzelner Nephrene durch Mikropunktion

Die Mikropunktion von Tubuli an der Nierenoberfläche wurde unter einem Stereoauflichtmikroskop (Leitz) bei 250-facher Vergrößerung durchgeführt. Dazu wurden zwei Mikromanipulatoren (Leitz), Pipettenhalter mit Öldrucksystemen und selbstgeschliffene Glaspipetten verwendet. Während des Versuchs wurde die Oberfläche der Niere durch eine Fiberglasoptik (Schott) beleuchtet. Die Fragestellung der Arbeit machte es notwendig, in jedem der untersuchten Nephrene mehrere Meßgrößen zu bestimmen.

1. Der hydrostatische intratubuläre Druck im proximalen Konvolut¹ bei Freiflußbedingungen. (Der Flüssigkeitsstrom im Tubulus durfte durch die Technik der Druckmessung nicht beeinträchtigt werden).
2. Die Inulin- und Teilchenkonzentration der Tubulusflüssigkeit, die das spätproximale Tubulussegment durchströmt. Damit ist der Abschnitt des proximalen Tubulus bezeichnet, der kurz vor dem absteigenden Teil der Henleschen Schleife² liegt.
3. Die Inulin- und Teilchenkonzentration der Flüssigkeit, die das fröhdistale Tubulussegment unmittelbar nach der Passage des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife³ durchströmt.

¹Pars contorta des Hauptstücks (auch Tubulus contortus I)

²Pars recta des Hauptstücks

³Pars recta des Mittelstücks

2.3.1 Identifizierung der Nephronsegmente zur Mikropunktion

Vor der Entnahme der geforderten Flüssigkeitsproben durch Mikropunktion mußten der spätproximale und frühdistale Abschnitt eines Nephrons identifiziert werden.

Dazu wurde ein Farbstoffbolus (Lissamingrün 2%) in den proximalen Tubulus injiziert. Es wurden Glaspipetten mit einem Spitzendurchmesser von 4 μ m verwendet. Bei diesem Spitzendurchmesser wird vermieden (57), daß ein Flüssigkeitsleck zwischen dem Lumen des Tubulus und dem renalen Interstitium entlang der Pipettenwand entsteht. Verlust von intratubulärer Flüssigkeit würde die Proben, die aus den nachfolgenden Teilen des Tubulus entnommen werden, erheblich verfälschen. Ein Leck an der Punktionsstelle war am Austritt von Lissamingrün in das Interstitium oder an die Nierenoberfläche erkennbar.

2.3.2 Messung des hydrostatischen Drucks im Tubuluslumen

Die mit Lissamin gefüllte Pipette war mit einem Quecksilbermanometer (modifiziert nach Gauer) verbunden, so daß mit ihr neben der Injektion eines Farbstoffbolus gleichzeitig der hydrostatische Druck im proximalen Tubulus gemessen werden konnte. Der Druck in der Pipette konnte über einen Druckausgleichsbehälter am Manometer eingestellt werden. Der intraluminale Druck war erreicht, wenn der Pipettendruck den Einstrom von Tubulusflüssigkeit gerade kompensierte.

2.3.3 Lineare Strömungsgeschwindigkeit durch die Henlesche Schleife

Durch die Messung der Zeit zwischen dem Verschwinden des Farbstoffbolus im spätproximalen Konvolut und dem Erscheinen im frühdistalen konnte die Lineargeschwindigkeit der intratubulären Flüssigkeit durch die Henlesche Schleife bestimmt werden.

2.3.4 Auswahl der Nephronen zur Probenentnahme

Der Farbstoffbolus wurde nicht nur injiziert, um spätere Punktionsstellen zu lokalisieren und lineare Flußgeschwindigkeiten zu bestimmen, sondern auch um geeignete Nephronen für den weiteren Versuchsablauf zu wählen. Es wurden nur solche Nephronen untersucht, deren früher distaler Tubulus an der Nierenoberfläche lag.

Durch die Art der Beleuchtung mit Hilfe der Fiberglasoptik konnte beobachtet werden, ob der Farbstoffbolus nach Verlassen der Henleschen Schleife noch tiefer unter der Nierenoberfläche gelegene Tubulusabschnitte durchlief, die der Mikropunktion nicht zugänglich gewesen wären, oder ob er beim Eintreten in das distale Konvolut direkt an der Nierenoberfläche erschien.

2.3.5 Entnahme von Flüssigkeit aus einzelnen Tubuli

Zum Sammeln der Tubulusflüssigkeit wurden angeschliffene Glaspipetten verwendet, die einen Spitzendurchmesser von 8 μm hatten. Ihre Füllung bestand zu Beginn der Mikropunktion aus Mineralöl, das mit Sudanblau gefärbt war. Zunächst wurde im fröhdistalen Tubulus Flüssigkeit entnommen. Dabei wurde eine stets gleichbleibende Technik angewendet:

Die Spitze der Pipette wurde zunächst an der Punktionsstelle auf die Nierenoberfläche aufgesetzt. Diese wurde dabei leicht eingedrückt und der Winkel zwischen Pipettenspitze und Nierenoberfläche etwas stumpfer. Beim nachfolgenden Vorschieben der Pipette, bei welchem diese in das Tubuluslumen eindrang, konnte durch den stumpfen Punktionswinkel eine größere Verletzung der Tubuluswand mit eventueller Leckentstehung vermieden werden. Es wurde zunächst ein Ölblock von der fünffachen Länge des Tubulusdurchmessers nach distal injiziert. Durch die Blockierung des Flüssigkeitsstroms im Tubuluslumen strömte durch eine kurzzeitige Erhöhung des hydrostatischen Drucks meist spontan Flüssigkeit in die Sammelpipette. Es

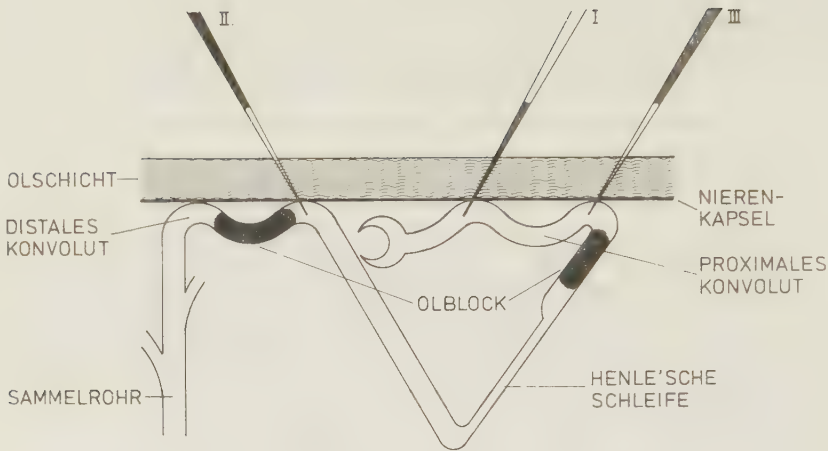


Abb. 2: Die Zeichnung dient der Veranschaulichung der Sammeltechnik am Einzelnephron.

- I. Punktion mit der Farbstoffpipette (Lissamin);
Messung des hydrostatischen intratubulären Drucks,
Messung der linearen Strömungsgeschwindigkeit
durch die Henlesche Schleife, Markierung der späteren
Punktionsstellen und Auswahl des untersuchten Nephrons.
- II. Entnahme von Flüssigkeit aus dem frühdistalen
Konvolut.
- III. Entnahme von Flüssigkeit aus dem spätproximalen
Konvolut.

wurde unabhängig von der Lokalisation der Punktionsstelle und vom Alter des Tieres in Perioden von 15 bis 20 Minuten gesammelt.

Nach der Probenentnahme wurden die Pipettenspitzen mit Mineralöl gefüllt, um eine Veränderung des Volumens und der Zusammensetzung der gesammelten Flüssigkeit durch Verdunstung oder Flüssigkeitsausstrom zu verhindern.

2.3.6 Fehlermöglichkeiten bei der Probenentnahme

Durch Aufstellen verschiedener Kriterien, die bei der Probenentnahme erfüllt sein mußten, wurde versucht, die Wahrscheinlichkeit systematischer Fehler so gering wie möglich zu halten. Proben, bei deren Entnahme diese Kriterien nicht erfüllt werden konnten, wurden verworfen.

Folgende Kriterien wurden aufgestellt:

1. Der Beginn des Flüssigkeitseinstroms in die Pipette mußte weitgehend spontan erfolgen. Nur so war gewährleistet, daß die Druckverhältnisse im punktierten Tubulus annähernd die gleichen waren, wie im nichtpunktierten.
2. Der Ölblock durfte während des Sammelns seine Lage nicht verändern. Eine Verschiebung des Ölblocks nach distal hätte einen Anstieg des intratubulären Drucks bedeutet.
3. Der Ölblock mußte die Mindestlänge des fünffachen Tubulusdurchmessers haben, denn nur so konnte gewährleistet sein, daß keine Flüssigkeit mitgesammelt wurde, die sich distal des Ölblocks befand.
4. Es durfte kein Leck an der Lissaminpipette entstehen. Dies hätte zur Verminderung der Stromrate im Tubulus geführt.
5. Das gesammelte Volumen mußte für die gesamte nachfolgende chemische Analyse ausreichend sein (Mindestmenge ca. $8 - 10 \times 10^{-12}$ L).
6. Die Sammelpipette mußte frei im Tubuluslumen liegen und durfte bei der Punktion des Lumens keine peritubulären

Kapillaren verletzt haben.

Die Punktion und die Flüssigkeitsentnahme im proximalen Tubulus wurden auf die gleiche Weise durchgeführt, wie im distalen Tubulus. Die Spitze der frühproximal liegenden Farbstoffpipette wurde während der distalen und proximalen Probenentnahme im Lumen des Tubulus belassen.

2.3.7 Identifizierung der Nephronsegmente zur Mikrodissektion

Nachdem die Flüssigkeitsproben zur Funktionsanalyse des Nephrons gewonnen waren, wurden in allen Nephronen die Henle-schen Schleifen und das distale Konvolut von der distalen Punktionsstelle her mit einem polymerisierenden Kunststoff gefüllt (Mikrofil). In einer Lageskizze der Nierenoberfläche wurden die distalen und proximalen Punktionsstellen für jedes Nephron eingetragen.

2.4 Mikrodissektion einzelner Nephronsegmente

Am Ende des Versuches wurde die freipräparierte und blutleere Niere gewogen, von Pol zu Pol halbiert und für 24 Stunden in 99%iges Isopropanol gelegt. Anschließend wurde die Niere weitere 24 Stunden in 1%iger Natronlauge mazeriert und bis zur Dissektion in 30%igem Glycerin aufbewahrt (32).

Nach dieser Behandlung war die Niere in ihrer Konsistenz sehr weich und transparent. Die Strukturen, die vorher mit Mikrofil gefüllt worden waren, blieben als Ausgußpräparat vollständig erhalten. Unter dem Mikroskop wurde die Länge der Schleife gemessen. Anschließend wurden mit einer Nadel und einer Pinzette das distale und proximale Konvolut bei 100-facher Vergrößerung freipräpariert und vermessen. Die Punktionsstelle, an der Tubulusflüssigkeit entnommen worden war, wurde auf Grund der Lageskizze identifiziert. So war es möglich, die Entfernung zwischen der Punktionsstelle im frühdistalen Tubulussegment und am Ende der aufsteigenden Schleife zu bestimmen.

2.5 Analyseverfahren

2.5.1 Analyse des Endharns und des Serums

Im Anschluß an die Entnahme der Tubulusproben im einzelnen Nephron wurden - wie beschrieben - über den Arterienkatheter Blutproben entnommen und zentrifugiert. Auf diese Weise wurden auch das Glomerulumfiltrat und die Natriumausscheidung der Gesamtniere fortlaufend gemessen. Die Inulinkonzentrationen im Serum und im Endharn wurden photometrisch mit der Anthromethode bestimmt (31). Die Natriumkonzentrationen wurden flammenphotometrisch gemessen. Die Osmolaritäten im Endharn und im Serum wurden ebenso wie die der Tubulusflüssigkeiten nach einer Mikromethode gemessen.

2.5.2 Analyse der Tubulusflüssigkeiten

2.5.2.1 Volumenmessung

Das Volumen der Tubulusproben wurde in einer geeichten Glaspipette mit konstantem Durchmesser unter dem Mikroskop gemessen. Die Spitze der Sammelpipette wurde dabei mit Hilfe eines Mikromanipulators in die mit Öl gefüllte Meßpipette eingeführt und die Tubulusprobe in die Ölsäule injiziert. Die Länge der Flüssigkeitssäule zwischen beiden Ölsäulen in der Meßpipette wurde bei 25-facher Vergrößerung durch ein Okularmikrometer bestimmt. Zur weiteren Analyse wurde die Flüssigkeit wieder in die Sammelpipette aufgesaugt und die Spitze durch Öl verschlossen. Die Volumina der Tubulusproben lagen im Bereich von $8 - 20 \times 10^{-12}$ L.

2.5.2.2 Bestimmung der Inulinkonzentration in der Tubulusflüssigkeit

Vor Beginn der Mikroanalyse wurden die gesammelten Tubulusflüssigkeiten auf den Boden einer silikonisierten und mit wasseräquilibriertem Öl gefüllten Glasschale gesetzt. Die Bestimmung der Inulinkonzentrationen in diesen kleinsten Volumina erfolgte durch eine modifizierte Anthronmethode (31).

Das für die Inulinmessung erforderliche Flüssigkeitsvolumen war etwa 5×10^{-12} L. Aus der Tubulusprobe, die sich auf dem Boden der Glasschale befand, wurde unter dem Mikroskop mit einer selbstgefertigten Glaspipette (Volumen ca. 5×10^{-12} L) Flüssigkeit entnommen. Die Pipette wurde durch einen Mikro-manipulator geführt und war an ein pneumatisches System angeschlossen. Mit einer weiteren, ebenfalls selbstgefertigten Pipette, die ungefähr ein um den Faktor 1000 größeres Volumen hatte, wurde in die Mulde einer Polyäthylenscheibe ein Tropfen Anthron gesetzt. Die Scheibe war mit einer Abdeckung versehen, um den Anthrontropfen während des ersten Analyseschrittes vor Licht, Wasserdampf und Staub zu schützen. Die aus der Tubulusprobe entnommene Flüssigkeit wurde in den Anthrontropfen pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich während des Pipettierens keine Luftblasen bildeten, da sich in früheren Analysen gezeigt hatte, daß Luftblasen im Anthron das Meßergebnis meist zu höheren Werten verändern. Im zweiten Analyseschritt wurde der Anthrontropfen mit der Tubulusflüssigkeit in eine gereinigte Glaspipette aufgesaugt, die anschließend an den Enden verschmolzen wurde. Die Länge der Pipette mußte dabei so gewählt werden, daß die Flüssigkeitssäule (Länge 2 cm) beim Zuschmelzen nicht durch Wärmeleitung erhitzt wurde. Diese gefüllten Pipetten wurden in einen speziellen Halter gesetzt und in einem 60° C heißen Wasserbad für 25 Minuten inkubiert. Außer den Tubulusflüssigkeiten waren auch Eich- und Nullwerte pipettiert worden. Nach der Inkubation und Reaktionsstop im kalten Wasser wurden die Extinktionen photometrisch gemessen. Dabei wurde eine spezielle Mikroküvette verwendet ("Schwarzglaspipette"). Aus der für jeden Versuch gemessenen Eichkurve und den Extinktionen der einzelnen Tubulusproben konnten die Inulinkonzentrationen bestimmt werden.

2.5.2.3 Bestimmung der osmotischen Konzentration in der Tubulusflüssigkeit

Die Messung der Osmolarität erfolgte in einem Mikroosmometer (Clifton Nanolitre Osmometer). Das zur Messung benötigte Volumen war kleiner als 1×10^{-9} L. Es wurde ebenfalls den Tubulusflüssigkeiten aus der silikonisierten Glasschale mit einer selbstgefertigten Pipette entnommen. Diese war durch einen Mikromanipulator geführt und mit einem Öldrucksystem verbunden. Die Proben wurden in die Bohrungen eines kupfernen Probenhalters einer Gefrierkammer pipettiert. In dieser konnten sehr exakt Temperaturen um den Gefrierpunkt eingestellt werden, deren Werte direkt ablesbar waren. Durch ein Mikroskop wurde die Kristallbildung innerhalb der Proben beobachtet und auf diese Weise der Gefrierpunkt bestimmt. NaCl-Lösungen bekannter osmotischer Konzentration dienten als Eichpunkte.

2.6 Auswertung

Aus den Meßdaten wurden die einzelnen Größen folgendermaßen errechnet:

a) GFR (glomeruläre Filtrationsrate)

$$\text{GFR} = \frac{\text{Endharnvolumen (pro Minute)} \times \text{Inulinkonz.i.Endharn}}{\text{Inulinkonz.i.Serum}}$$

b) Fraktionelle Natriumresorption (Natriumresorption in Prozent des filtrierte Natriums)

$$\text{Na-Resorpt.} = \frac{(\text{Na-Konz.i.Serum} \times \text{GFR} - \text{Na-Konz.i.Endh.} \times \dot{V}) \times 100}{\text{Na-Konz.i.Serum} \times \text{GFR}}$$

c) fraktionelle Wasserresorption

$$\frac{\text{Inulinkonzentration im Endharn}}{\text{Inulinkonzentration im Serum}}$$

d) NGFR (glomeruläre Filtrationsrate des Einzelneurons)

$$\text{NGFR} = \frac{\dot{V} \text{ der Tubulusflüssigkeit} \times \text{Inulinkonz. der Tubulusflüssigk.}}{\text{Inulinkonz.i.Serum}}$$

e) Volumenresorption im proximalen Tubulus

$$\text{Vol.-Resorpt. i. prox. Tub.} = \text{NGFR} - \frac{\text{NGFR} \times \text{In.Konz.i.Serum}}{\text{In.Konz.i.d.Tubulusflüssigk. prox.}}$$

f) Volumenresorption in der Henleschen Schleife

$$\text{Volumenresorption} = \frac{\text{NGFR} \times \text{In.Konz.i.Serum}}{\text{In.Konz.i.der Tubulusflüssigkeit prox.}} -$$

$$\frac{\text{NGFR} \times \text{In.Konz.i.Serum}}{\text{In.Konz.i.der Tubulusflüssigkeit dist.}}$$

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Versuchsprotokolls

Bei der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste Analyse der Funktion der Henleschen Schleife in situ während der Ontogenese. Die funktionelle Entwicklung dieses Nephron-segments wurde an beiden Altersgruppen nach dem gleichen Versuchsprotokoll untersucht, welches im Folgenden durch einen entsprechenden Versuchsablauf dargestellt wird:

13.5.1975 Ratte ♀ 48 g; salzreich ernährt; Alter: 15 d

7⁴⁵ Narkose
8¹⁰ Start Infusion 0.3 ml/h + Nembutal
9⁰⁰ Start Urin I, 60 min 0.601 g
9⁴⁵ Lissamininjektion, Passagezeit 24 sec
Druck intratubulär: 9 mmHg
9³⁰ TF₁ distaler Tubulus
Tubulusflüssigkeit strömt spontan in die Sammelpipette
Sammeldauer: 7 min 4 sec
TF₂ proximaler Tubulus
Tubulusflüssigkeit strömt zu Beginn der Sammelzeit nur durch Unterdruck im Öldrucksystem in die Sammelpipette
Sammeldauer: 4 min 55 sec
10⁰⁰ Start Urin II, 35 min
10⁰⁵ Serum I
10¹⁰ TF₃ distal, spontan, 5 min 40 sec
TF₄ proximal, spontan, 2 min 46 sec
10³⁵ Start Urin III
10⁴⁰ Serum III
10⁴⁵ TF₅ distal, 7 min 35 sec, spontan
TF₆ proximal, 5 min, spontan
11⁰⁰ Serum IV

Nierengewicht 0.26 g

Zur besseren Verdeutlichung des Protokollverlaufs wurden die einzelnen Versuchsschritte auf einer Zeitachse aufgetragen (Abb. 3).

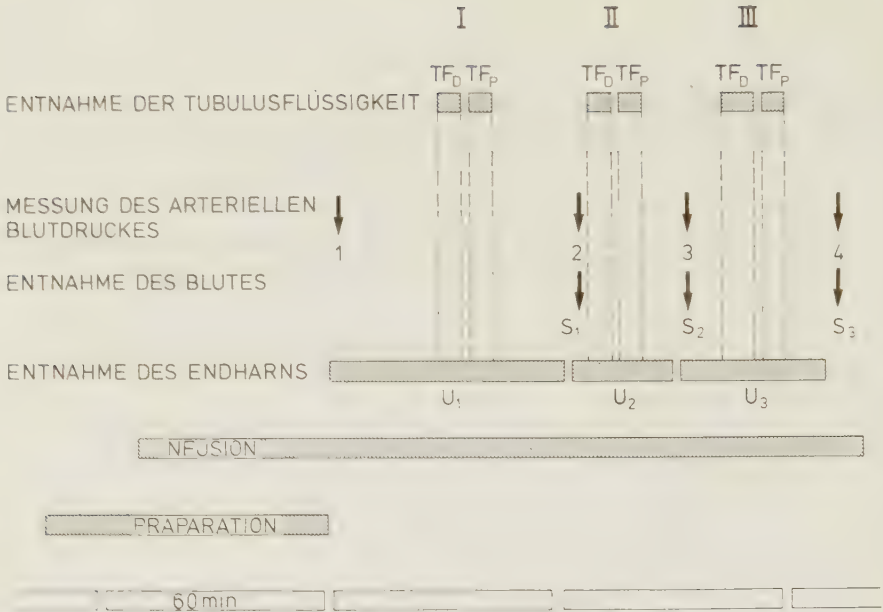


Abb. 3: Versuchszeitdiagramm

Die schraffierten Flächen drücken die Zeitspannen verschiedener Versuchsschritte wie Präparation, Infusion, Entnahme des Endharns (U_1 , U_2 , U_3) und Entnahme der Tubulusflüssigkeiten (TF_D =distal, TF_P =proximal) aus und geben ihre zeitliche Beziehung zueinander an. Am unteren Bildrand ist ein Zeitmaßstab in 60 min-Perioden aufgetragen (nicht schraffierte Fläche). Messungen des arteriellen Blutdrucks und Entnahme des Serums sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Im Abschnitt "Präparation" wurden die Tiere nach der Beschreibung in "2.2 Präparation" auf den eigentlichen Versuch vorbereitet. Die Infusion, welche eine Erhaltungsdosis Nembutal enthielt, wurde bereits nach Beendigung der Halspräparation begonnen (8^{10}), um bis zum Beginn des Versuchs einen konstanten Plasmainulinspiegel nach abgeschlossener Äquilibration der extrazellulären Räume zu erhalten.

Mit dem Start der ersten Urinsammelperiode (9^{00}) beginnt der Versuch. Im obigen Fall wurde bei der ersten Periode 60 min gesammelt. Kurz nachdem das Urinsammelgefäß mit dem Ureterenkatheter verbunden war, wurden der arterielle Blutdruck und die rektale Temperatur geprüft. Dies wiederholte sich auch bei den anderen Urinsammelperioden. Blutdruck und Temperatur wurden nur dann im Protokoll vermerkt, wenn die gemessenen Werte nicht den vermuteten entsprachen.

Als Norm für den mittleren arteriellen Blutdruck wurden Werte zwischen 80 mmHg und 110 mmHg angesehen; die erwartete Körpertemperatur war 37° C. Bei Blutdruckwerten unter 80 mmHg wurde der Versuch abgebrochen.

Ursachen für einen vorzeitigen Blutdruckabfall waren meist eine zu tiefe Narkose, ein Peritonealschock durch eine nicht schonend durchgeführte Baucheröffnung, eine stärkere intra-abdominelle Blutung und Volumenverlust bei der Blutentnahme.

Aus der Zeitspanne zwischen " 9^{00} Start Urin I" und 9^{30} wird ersichtlich, wieviel Zeit verwandt wurde, ein für die Punktion geeignetes Nephron zu wählen (Auswahlkriterien siehe unter "4.3 Mikropunktion"). Mit der ersten Farbstoffinjektion (9^{05} im obigen Experiment) wurden die Passagezeit durch die Henlesche Schleife und der intratubuläre hydrostatische Druck im proximalen Tubulus vor der Probensammlung gemessen.

Kurz nach den Startzeiten von Urin II (10^{00}) und Urin III (10^{35}) sowie am Ende des Versuchs wurden über den Arterienkatheter Blutproben entnommen. Nach Bestimmung der Inulinkon-

zentration konnte ein Profil des Seruminulinspiegels für jede Zeit des Versuchs erstellt werden.

3.2 Funktion der Gesamtniere

3.2.1 Glomeruläre Filtrationsrate

Aus den Inulinkonzentrationen im Endharn und im Serum sowie aus dem Urinzeitvolumen wurde die Inulinclearance für die jeweilige Urinsammelperiode errechnet. Während Inulinkonzentration und Volumen des Endharns direkt gemessen werden konnten, mußte die Serum-Inulinkonzentration für die jeweilige Urinsammelperiode aus dem Plasmainulinprofil ermittelt werden. Das auf diese Weise errechnete Glomerulumfiltrat wurde für ein Gramm Nierengewicht angegeben. So wird erkennbar, ob Veränderungen der glomerulären Filtrationsrate während der Ontogenese proportional oder disproportional zur Zunahme der Nierengewebsmasse verlaufen.

Die Größe des Glomerulumfiltrats wurde entsprechend der Fragestellung der Arbeit nicht nur zur Definition des Entwicklungsgrades herangezogen, sondern war zugleich ein wichtiges Kriterium für die Qualität der Präparation. Wurden Glomerulumfiltrate unter 0.4 ml/g Niere gemessen, war dies meist ein Hinweis auf eine Schädigung der Niere (Verletzung, Infarzierung etc.) oder auf einen niedrigen arteriellen Blutdruck (gemittelter Druck unter 80 mmHg).

In der Abbildung 4 sind die Glomerulumfiltrate gegen das dazugehörige Nierengewicht aufgetragen. Man erkennt, daß das Glomerulumfiltrat disproportional mit dem Nierengewicht bzw. mit zunehmendem Alter ansteigt.

3.2.2 Resorption des tubulären Natriumloads

Als Maß für die tubuläre Funktion der Niere kann die Höhe der Natriumrückresorption betrachtet werden. In der gesunden Niere findet sich eine fast vollständige Rückresorption des tubulären Natriumloads ($> 99\%$).

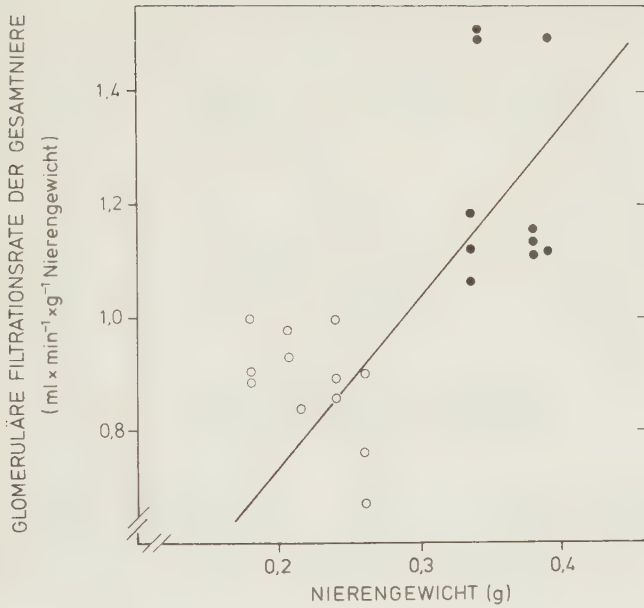


Abb. 4: Beziehung von glomerulärer Filtrationsrate der Gesamtniere und Nierengewicht während der postnatalen Entwicklung.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: GFR

Gruppe I: 0.792 ± 0.25 (ml/min/g Nierengewicht)

Gruppe II: 1.257 ± 0.2 (ml/min/g Nierengewicht)

Regression:

$$y = 0.348 + 2.385 x$$

In Abbildung 5 ist die Natriumresorption in Prozent des tubulären Natriumloads gegen das Nierengewicht aufgetragen. Die Mittelwerte beider Altersgruppen (Gruppe I: 99.589%; Gruppe II: 99.826%) sprechen für eine voll erhaltene tubuläre Funktion. Der Unterschied zwischen beiden Werten ist nicht signifikant.

3.2.3 Resorption des tubulären Volumenloads

Die fraktionelle Wasserresorption errechnet sich aus der Inulinkonzentration im Endharn und der Inulinkonzentration im Serum, die der Inulinkonzentration im Ultrafiltrat entspricht. Der Quotient

$$\frac{\text{Inulinkonzentration im Endharn}}{\text{Inulinkonzentration im Serum}}$$

gibt den Faktor an, um den sich die Inulinkonzentration der intratubulären Flüssigkeit im Verlauf des gesamten Nephrons multipliziert hat. Er ist somit ein Maß der renalen Wasserresorption. Aus Abbildung 6 ersieht man, daß die fraktionelle Wasserresorption ($U_{\text{Inulin}}/P_{\text{Inulin}}$) mit zunehmendem Nierengewicht deutlich ansteigt.

3.3 Funktionsentwicklung des Nephrons

3.3.1 Glomeruläre Filtrationsrate des Nephrons

Die Einzelglomerulumfiltrate wurden aus den Quotienten der Inulinkonzentration in den Tubulusproben und im Serum (Bestimmung aus dem Plasmainulinprofil) und aus der pro Minute gesammelten Mengen an Tubulusflüssigkeit bestimmt. Für jedes Nephron wurden zwei Einzelglomerulumfiltrate errechnet (NGFR), da im gleichen Nephron eine distale und eine proximale Tubulusprobe entnommen worden war. Die in Abbildung 7 aufgetragenen Werte der einzelnen Glomerulumfiltrate stellen die Mittelwerte aus distaler und proximaler Berechnung eines jeden Nephrons dar. Man erkennt in der Abbildung, daß die Höhe der Nephronfiltrationsrate vom Differenzierungsgrad bzw. vom Nierengewicht abhängig ist.

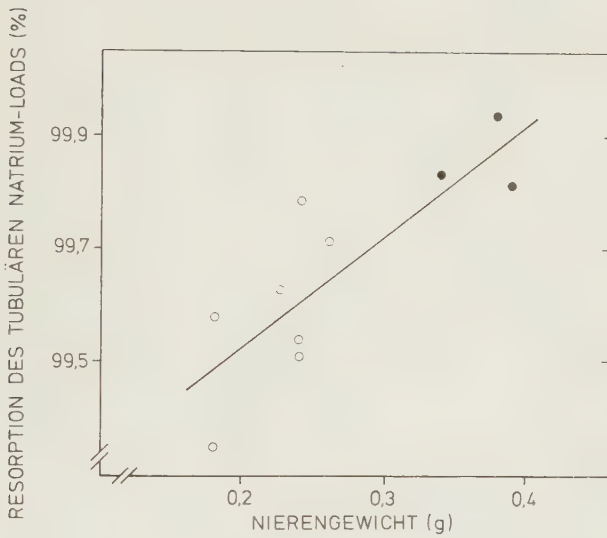


Abb. 5: Beziehung von Nierengewicht und Resorption des tubulären Natriumloads (%) während der postnatalen Entwicklung.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: Na-Resorption

Gruppe I: 99.589%

Gruppe II: 99.826%

Regression:

$$y = 99.14 + 1.95 x$$

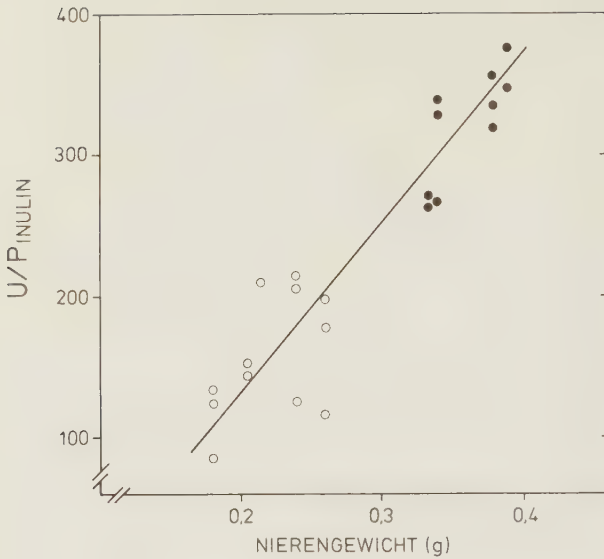


Abb. 6: Beziehung von Nierengewicht und fraktioneller Wasserresorption (Inulinkonzentration im Urin/Inulinkonzentration im Plasma) während der postnatalen Ontogenese der Rattenniere.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: frakt. Wasserresorption

Gruppe I: 162.71 ± 44.24

Gruppe II: 324 ± 45.01

Regression:

$$y = - 95.59 + 1163.34 \times x$$

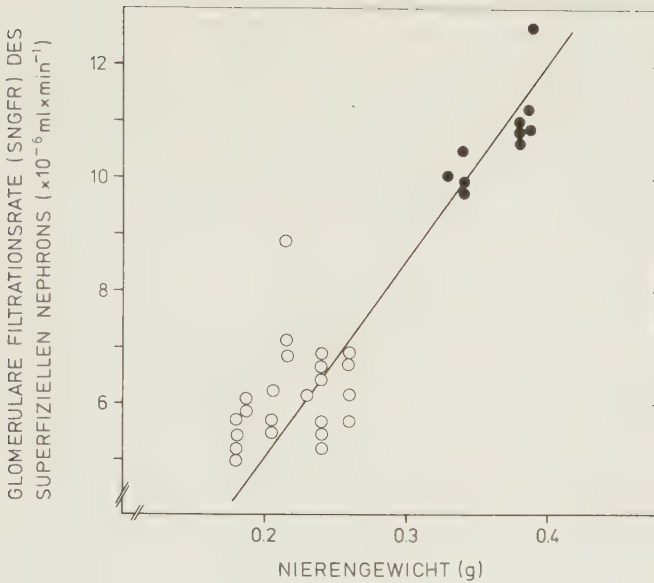


Abb. 7: Beziehung von Nierengewicht und Nephronfiltrationsrate während der postnatalen Entwicklung der Ratteniere.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte für die erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: Nephronfiltrationsraten

Gruppe I: 6.07 ± 0.85 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)

Gruppe II: 11.37 ± 1.48 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)

Regression:

$$y = - 1.12 + 33.32 x$$

Frühere Messungen an nicht salzreich ernährten Tieren hatten gezeigt, daß Unterschiede zwischen dem aus distalen und proximalen Tubulusproben errechneten Einzelglomerulumfiltrat bestehen. Um zu überprüfen, ob bei den hier untersuchten Tieren, die salzreich ernährt worden waren, ähnliche Verhältnisse vorliegen, wurden für jedes Nephron distal gemessene NGFR gegen proximal gemessene aufgetragen. In Abbildung 8 erkennt man, daß die beiden Filtrate nicht signifikant verschieden voneinander sind.

3.3.2 Volumenresorption im proximalen Tubulus

Aus den Inulinkonzentrationen im endproximalen Tubulus, d.h. am Beginn der von der Nierenoberfläche erreichbaren Henleschen Schleife, sowie aus der Serum-inulinkonzentration wurde ein Quotient gebildet: das $TF_{Inulin}/Plasma_{Inulin}$. Dieser Quotient ist ein Maß der Flüssigkeitsresorption, die im proximalen Tubulus zwischen Glomerulus und Punktionsstelle stattgefunden hat. Je mehr sich der Quotient dem Wert 1 nähert, desto weniger des filtrierte Volumens wird resorbiert. Vergleicht man die Quotienten der verschiedenen Altersgruppen miteinander, so sieht man, daß das $TF_{Inulin}/Plasma_{Inulin}$ in der Gruppe I niedriger ist als in der Gruppe II. Dies bedeutet, daß zu Beginn der postnatalen Entwicklung bei salzreich ernährten Tieren ein geringerer Anteil des in den proximalen Tubulus eingeströmten Volumens resorbiert wird. In Abbildung 9 ist die absolute Flüssigkeitsresorption im proximalen Konvolut gegen die Volumeneinstromrate bzw. Nephronfiltrationsrate aufgetragen.

Die unterbrochene Linie steht für den Fall, daß während der gesamten Entwicklung der Quotient aus Filtrationsrate und Volumenresorption im proximalen Konvolut gleich ist; d.h. während der gesamten postnatalen Entwicklung wird der gleiche Anteil des in den Tubulus eingeströmten Volumens resorbiert. Die durchgezogene Linie bildet die Regressionsgerade der tatsächlichen Quotienten der Gruppe I. Man erkennt in

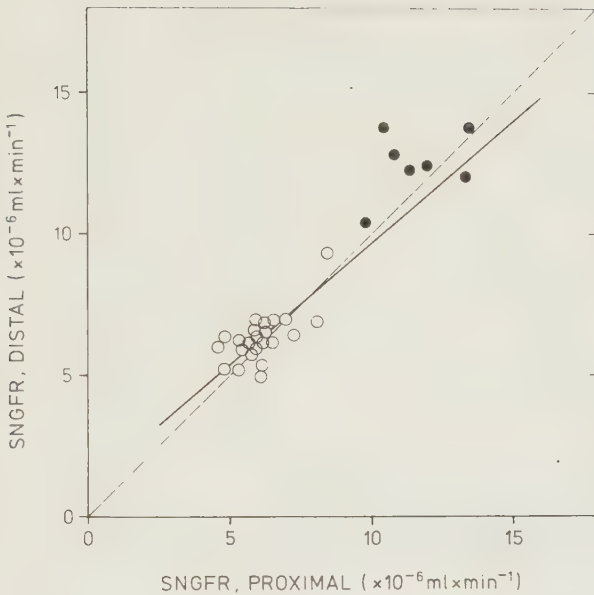


Abb. 8: Beziehung von proximal bestimmter Einzelglomerulumfiltrationsrate zu distal bestimmter. Die unterbrochene Linie steht für den Fall der Identität beider Filtrate. Die durchgezogene Linie zeigt die tatsächlichen Verhältnisse.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: Nephronfiltrationsraten

Gruppe I: 6.12 ± 1.31 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)

Gruppe II: 11.57 ± 1.15 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)

Regression:

$$y = 1.03 + 0.86 x$$

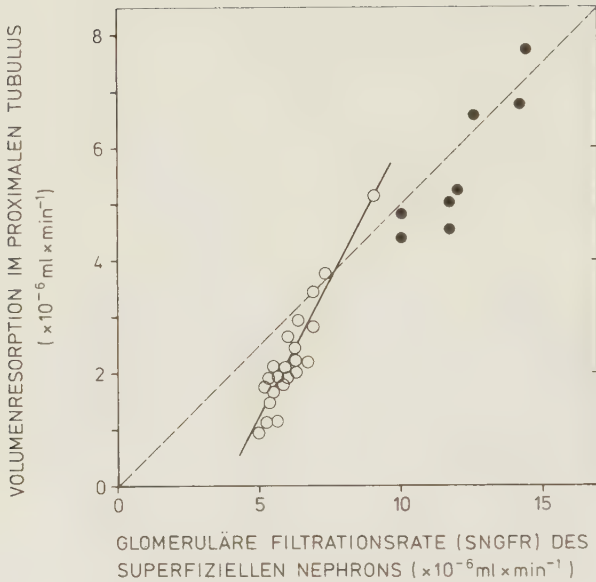


Abb. 9: Beziehung von glomerulärer Filtrationsrate und Volumenresorption im proximalen Tubulus. Die unterbrochene Linie steht für den Fall einer gleichbleibenden fraktionellen Volumenresorption während der postnatalen Entwicklung. Die durchgezogene Linie stellt die Regressionsgerade der Werte für die frühe postnatale Altersgruppe dar.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: SNGFR / Volumenresorp.i.prox.Tubulus
 Gruppe I: 5.99 ± 0.91 / 2.23 ± 0.95 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)
 Gruppe II: 11.73 ± 1.53 / 5.28 ± 1.23 " "

Regression:
 $y = - 356 + 0.96 x$

der Abbildung 9, daß die relative Resorptionsleistung während der frühen postnatalen Entwicklung niedriger ist.

3.3.3 Volumenresorption in der Henleschen Schleife

Auch die Beziehung von Volumeneinstrom und Flüssigkeitsresorption in der Henleschen Schleife war während der Entwicklung nicht konstant. In der frühen postnatalen Phase wurden $34 \pm 8\%$ (Gruppe I) des in die Henlesche Schleife eingeströmten Volumens resorbiert. Bei den erwachsenen Tieren stieg dieser Wert auf $49 \pm 6\%$ (Gruppe II) an. In Abbildung 10 wurde die Einstromrate in die Henlesche Schleife gegen die Flüssigkeitsresorption aufgetragen.

3.3.4 Intratubulärer hydrostatischer Druck im proximalen und distalen Tubulus

Die Messung der intratubulären hydrostatischen Drucke im proximalen Konvolut ergab bei beiden Versuchsgruppen nahezu identische Werte (Abb. 11). Die Messung der distalen Drucke wurde an einem anderen Rattenkollektiv durchgeführt, da sich in Vorversuchen die Messung von distalem Druck und das Sammeln von Flüssigkeit in demselben Nephron als zu schwierig und zu ungenau erwiesen hatte. Die Auswahl der Ratten erfolgte nach denselben Richtlinien. Auch bei den distalen Drucken zeigte sich keine Veränderung (Mittelwerte Gruppe I: 4.02 ± 0.04 (mmHg); Gruppe II: 4.0 ± 0.03 (mmHg)).

3.3.5 Intratubulärer osmotischer Druck im distalen Tubulus

Da, wie im Vorhergehenden beschrieben, der dicke aufsteigende Schleifenanteil beim Nephron in situ der direkten Punktion nicht zugänglich ist, mußten in einem direkt an die Henlesche Schleife anschließenden Tubulussegment Proben entnommen werden. Die Punktionsstellen konnten später mit Hilfe eines intratubulär injizierten Kunststoffes und anschließender Dissektion des Nierengewebes exakt identifiziert und ihr Abstand vom Ende des dicken aufsteigenden Teils der Schleife vermessen werden.

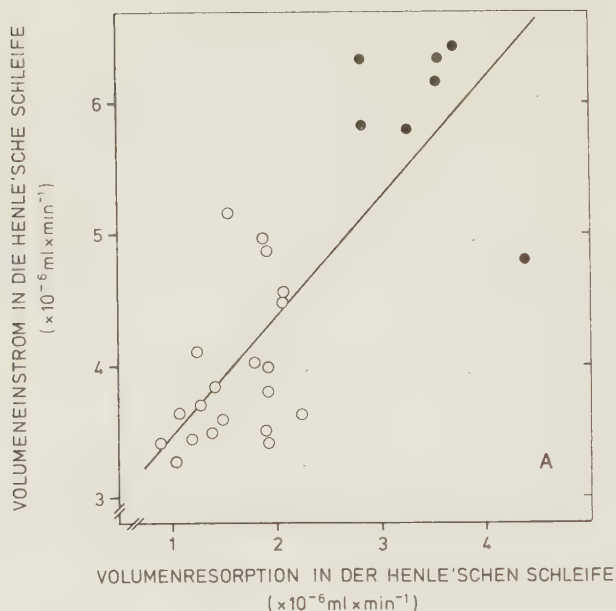


Abb. 10: Beziehung von Volumeneinstrom in die Henlesche Schleife und Volumenresorption.

Kreise: Werte für die frühe postnatale Tiergruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: Volumeneinstrom / Volumenresorption

Gruppe I: 3.88 ± 0.66 / 1.57 ± 0.46 ($\times 10^{-6} \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$)

Gruppe II: 5.95 ± 0.57 / 3.45 ± 0.56 (" ")

Regression:

$$y = 2.49 + 0.94 x$$

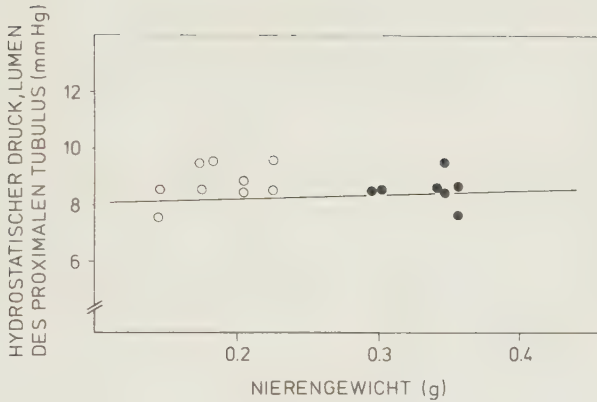


Abb. 11: Beziehung von Nierengewicht und hydrostatischem Druck im Lumen des proximalen Tubulus.
Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)
Punkte: Werte der erwachsenen Tiere (Gruppe II)
Mittelwerte:
Gruppe I: 8.778 ± 0.607 (mmHg)
Gruppe II: 9 ± 0.58 (mmHg)
Regression:
 $y = 2.27 x + 8.23$

Aus den Abständen konnte errechnet werden, daß die Punction in den ersten $8.7 \pm 1.9\%$ der Länge des distalen Tubulus erfolgte. Dies bedeutet, daß in jedem untersuchten Nephron nahezu gleiche Abstände zwischen der distalen Punctionsstelle und dem Ende der aufsteigenden Schleife vorlagen. Veränderungen der intratubulären Flüssigkeit, die sich innerhalb dieses kurzen Nephronsegments ereigneten, kamen somit bei allen untersuchten distalen Tubulusproben in gleicher Weise zum Ausdruck.

Bei der Betrachtung der osmotischen Aktivität dieser Proben zeigt sich, daß die Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe nahe an Isotonie liegen, während bei den erwachsenen Tieren eine beträchtliche Senkung der Osmolarität unter Plasmaisotonie stattgefunden hat (Abb. 12).

Der Quotient aus der osmotischen Konzentration der Tubulusflüssigkeit am Ende der Henleschen Schleife und aus der osmotischen Konzentration im proximalen Tubulus war 0.92 ± 0.07 bei den Tieren der Gruppe I und 0.63 ± 0.05 bei den Tieren der Gruppe II.

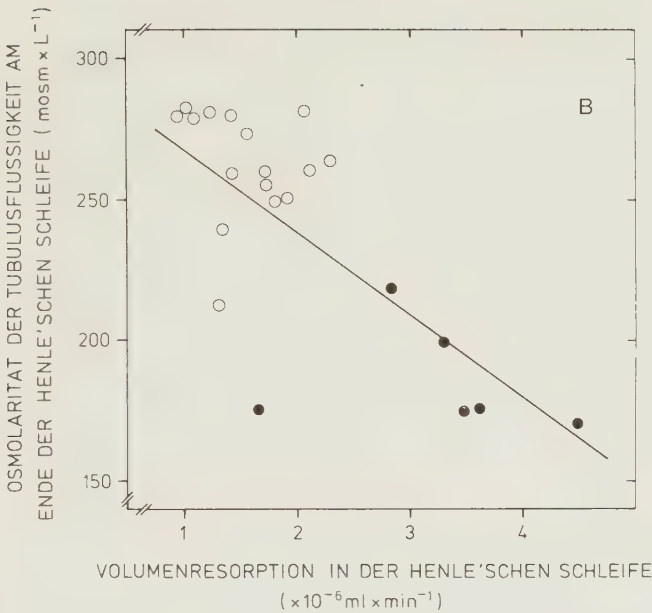


Abb. 12: Beziehung von Volumenresorption in der Henleschen Schleife und osmotischer Aktivität der Tubulusflüssigkeit am Ende der Henleschen Schleife.

Kreise: Werte für die Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe (Gruppe I)

Punkte: Werte für die erwachsenen Tiere (Gruppe II)

Mittelwerte: Osmolarität / Volumenresorption

Gruppe I: 264.27 ± 20.42 (mosmol/L) / 1.50 ± 0.39 (x 10⁻⁶ ml x min⁻¹)

Gruppe II: 186 ± 18.73 (") / 3.22 ± 0.98 (" ")

Regression:

$y = 303.36 - 30.86 x$

4. Diskussion

4.1 Entwicklung der Nierenfunktion als Summe von Einzelfunktionen

Die Daten, die durch Analyse der Endharnproben und des Serums gewonnen wurden - osmotischer Druck des Endharns als Ausdruck der maximalen osmotischen Konzentrierungsleistung der Niere, glomeruläre Filtrationsrate, Resorption des tubulären Natriumloads, sowie das $U_{\text{Inulin}}/P_{\text{Inulin}}$ als Maß für die fraktionelle Wasserresorption - sind als Summe zahlreicher und in ihrem Ausmaß unterschiedlicher Einzelfunktionen zu betrachten. Sie geben Auskunft über die entwicklungsbedingten Funktionsänderungen des gesamten Organs und sind nicht unmittelbar repräsentativ für die Differenzierung des in dieser Arbeit untersuchten superfiziellen Nephrons, da die Nierenrinde ein Profil verschiedener Nephronpopulationen zeigt, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion unterscheiden (21, 47, 62).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen eine deutliche Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Tiere auf und bestätigen somit, daß sicherlich bei den Tieren der frühen postnatalen Altersgruppe die Differenzierung der Nierenfunktion noch nicht abgeschlossen ist. Die gute Übereinstimmung dieser Daten mit bereits bekannten (6, 17, 32) zeigt außerdem, daß die in dieser Arbeit bestehenden Versuchsbedingungen keinen wesentlichen Einfluß auf die verschiedenen Nierenfunktionen hatten.

4.2 Entwicklung der Nierenfunktion als Differenzierung des Einzelnephrons

4.2.1 Glomerulumfiltrat des Einzelnephrons

Das tubuläre Volumenload des einzelnen superfiziellen Nephrons nimmt nach den in dieser Arbeit vorliegenden Befunden disproportional zum Nierengewicht zu. Dies wird durch frühere Befunde weitgehend bestätigt (31, 33, 68).

Als wesentliche Ursache für den Anstieg des Glomerulumfiltrats wird die Zunahme der hydraulischen Leitfähigkeit der glomerulären Kapillare angesehen, da der effektive Filtrationsdruck während der frühen postnatalen Entwicklung konstant bleibt und der Zuwachs der Kapillarfläche nur zu 12% für die Zunahme des GFR verantwortlich ist (33). Gestützt wird diese Hypothese durch Messungen der Clearance großmolekularer Dextrane, deren Ergebnisse eine Vergrößerung des Porenäquivalents der glomerulären Kapillare vermuten lassen (67). Während ein Dextran mit dem Molekulargewicht 15000 im frühen postnatalen Alter kaum filtriert wird, d.h. seine Clearance den Wert Null annimmt (Porenäquivalent 20 Å), erreicht sie bei erwachsenen Tieren 90% der Inulinclearance, was für einen hohen Anstieg der Filtrierbarkeit spricht (Porenäquivalent 40 Å).

Durch die Befunde zahlreicher Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Größe des tubulären Volumenloads des Einzelnephrons der differenzierten Niere durch einen tubuloglomerulären Rückkopplungsprozeß beeinflußt wird (30, 44, 58, 59, 60). Veränderungen der Tubulusflüssigkeit im Bereich der Macula densa, einer Struktur des fröhdistalen Konvoluts, die in engster räumlicher Beziehung zum Glomerulum des gleichen Nephrons steht, scheinen für die Regulation ausschlaggebend. Erhöhung sowohl des Volumen- als auch des Natrium- und Chloridloads in diesen Nephronabschnitten rufen eine Senkung der NGFR durch Erhöhung des Gefäßwiderstands der afferenten Arteriole hervor (64, 65). Dies erfolgt durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems: Die oben genannten Veränderungen der Tubulusflüssigkeit führen zu einer Freisetzung von Renin in den Epitheloidzellen des glomerulären Gefäßpols, der in unmittelbarer Nachbarschaft der Macula densa liegt. Dies führt über Zwischenschritte zur Aktivierung des vasoaktiven Angiotensin II und somit zur Konstriktion der afferenten Arteriole des Glomerulum.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Flüssigkeitsentnahme im frühdistalen Tubulus nach der oben beschriebenen Technik beeinflusst das tubuläre Load im Bereich der Macula densa nicht, da dieses Tubulussegment proximal der Punktionsstelle liegt. Probenentnahme im proximalen Konvolut hingegen führt zu einem Sistieren des intratubulären Flüssigkeitsstroms im Bereich der Macula densa auf Grund des distal der Sammelpipette intratubulär gelegenen Ölblocks. Es kommt nach den bereits genannten Mechanismen unter gewissen Voraussetzungen der NaCl-Homöostase zu einem Ausbleiben bzw. zu einer Senkung der Reninausschüttung und somit zu einem Anstieg der Filtrationsrate im betreffenden Glomerulum (12).

In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen proximal und distal bestimmter Filtrationsrate nicht gefunden. Diese Beobachtung trifft sowohl auf erwachsene als auch auf Tiere der frühen postnatalen Altersgruppe zu. Diese zunächst widersprüchlichen Daten stimmen mit früheren Befunden, die an erwachsenen, ebenfalls salzreich ernährten Tieren erhoben wurden, überein (15, 38).

Der tubuloglomeruläre Regulationsmechanismus verhindert über die Variation des Glomerulumfiltrats akute Natriumchlorid- und Volumenverluste. Durch die Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate wird das tubuläre Load in den distalen Nephronabschnitten gesenkt. Es kommt zu einer Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Tubulusflüssigkeit und Tubulusepithel und damit zu einer Zunahme der fraktionellen Natriumrückresorption.

Bei salzreich ernährten Tieren ist die Empfindlichkeit des Regulationssystems vermindert. Die Reninausschüttung ist minimal (15, 38). Eine Zunahme des Glomerulumfiltrats durch weiteres Absenken der Reninaktivität ist nicht mehr möglich. Dies zeigt sich in der Identität distal und proximal bestimmter Nephronfiltrationsraten bei salzreich ernährten Tieren.

Bei den Tieren der frühen postnatalen Altersgruppe, die in der vorliegenden Arbeit ein gleiches Verhalten der Nephron-filtrationsraten zeigen, scheint die Identität der Filtrate kein altersspezifisches Phänomen zu sein, sondern ebenfalls aus der chronischen Salzbelastung zu resultieren. Dafür sprechen Befunde, die eine hohe Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems während der Ontogenese belegen (39).

4.2.2 Volumenresorption in der Henleschen Schleife während der frühen postnatalen Entwicklung

Die Volumenresorption über die Gesamtlänge der Henleschen Schleife wurde als Differenz von spätproximaler und frühdistaler intratubulärer Flußrate definiert. Da die Größe des Volumenloads der Schleife während der Differenzierung zunimmt, wurde die Resorption als Fraktion des pro Zeiteinheit einströmenden Volumens (endproximale, intratubuläre Flußrate) errechnet.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich ein deutlicher Anstieg dieser fraktionellen Volumenresorption mit zunehmendem Alter.

Auf- und absteigender Schenkel der Henleschen Schleife weisen unterschiedliche hydraulische Leitfähigkeiten auf. Während sie im aufsteigenden Schenkel sehr niedrig ist und zusammen mit der hier stattfindenden Natriumresorption (11,¹ 54) die Bildung von hypotoner intratubulärer Flüssigkeit gewährleistet, finden sich im absteigenden Teil sehr hohe hydraulische Leitfähigkeiten. Es ist also anzunehmen, daß ein Anstieg der fraktionellen Volumenresorption in der Henleschen Schleife während der postnatalen Entwicklung im wesentlichen auf Resorptionsveränderungen im Bereich des absteigenden Schleifenschenkels beruht.

Unter der Voraussetzung eines nicht abgeschlossenen osmotischen Angleichs zwischen Interstitium und intratubulärer Flüssigkeit am Ende des absteigenden Schleifenteils wären zwei

mögliche Ursachen zu nennen, die für den Anstieg der fraktionellen Volumenresorption verantwortlich sein könnten:

1. Eine Verlängerung der Kontaktzeit zwischen intratubulärer Flüssigkeit und Flächeneinheit der Henleschen Schleife;
2. Eine Zunahme der hydraulischen Leitfähigkeit des Schleifenepithels während der postnatalen Differenzierung.

Durch eine Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Tubulusflüssigkeit und Schleifeninnenfläche würde der Nettowasserausstrom über die Gesamtlänge der Henleschen Schleife durch Verlängerung der Diffusionszeit zunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Längen der Henleschen Schleifen und die Passagezeit der Tubulusflüssigkeit durch die Schleifen bestimmt. Die hieraus errechnete Kontaktzeit pro Längeneinheit der Schleife beträgt demnach für die Tiere der frühen postnatalen Gruppe $10 \text{ sec}/10^{-3} \text{ m}$ und für die erwachsenen $5 \text{ sec}/10^{-3} \text{ m}$. Nähme man an, daß der Tubulusradius im Bereich der Henleschen Schleife bei erwachsenen Tieren um 100% größer wäre als bei neonatalen Tieren, was nicht zu erwarten ist, würde sich für die jüngeren Tiere dennoch eine längere Kontaktzeit zwischen Tubulusflüssigkeit und Flächeneinheit der Henleschen Schleife ergeben.

Eine Veränderung der hydraulischen Leitfähigkeit des absteigenden Schleifenschenkels während der postnatalen Entwicklung kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt (31), daß ein osmotischer Angleich zwischen intratubulärer Flüssigkeit und Nierenmark in den Henleschen Schleifen juxtamedullärer Nephronen sowohl reifer als auch neonataler Nieren stattfindet.

Diese Befunde lassen eine Beteiligung von Wasserleitfähigkeitsveränderungen am Anstieg der fraktionellen Volumenresorption in dieser Nephronpopulation ausschließen. Es ist anzunehmen, daß dies auch für die in dieser Arbeit untersuchte superfizielle Nephronpopulation zutrifft.

Wahrscheinlicher ist deshalb, daß die Zunahme der fraktionellen Volumenresorption in der Henleschen Schleife durch eine Vergrößerung der Diffusionsfläche, vor allem aber durch einen Anstieg des osmotischen Gradienten zwischen Tubulusflüssigkeit und Interstitium bedingt ist.

Dies wird durch folgende Befunde gestützt:

1. Es erfolgt eine Längenzunahme der Schleifen superfizieller Nephronen während der Entwicklung. Sie erreichen zunächst die Rinden-Mark-Grenze und schließlich die Außenzone des Nierenmarks (21, 47, 62);
2. Die osmotische Aktivität des Nierenmarks nimmt während der postnatalen Ontogenese zu (63, 69).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Zunahme der Volumenresorption im absteigenden Teil der Henleschen Schleife zum größten Teil auf einen Anstieg des Nettowasserstroms pro Flächeneinheit zurückzuführen ist, der im wesentlichen durch eine Zunahme der osmotischen Konzentrationsdifferenz bewirkt wird.

4.2.3 Osmotische Verdünnungsfähigkeit der Henleschen Schleife

Der osmotische Druck der Tubulusflüssigkeit am Ende der aufsteigenden Henleschen Schleife ist ein Maß für die Natriumchloridresorption in diesem Schleifenteil.

In der vorliegenden Arbeit fand sich bei den Tieren der frühen postnatalen Altersgruppe eine nahezu isotone frühdistale Tubulusflüssigkeit, während die erwachsenen Tiere eine Osmolarität zeigten, die auf 186 ± 18.7 mosmol/L reduziert war. Die Werte der erwachsenen Tiere decken sich mit Befunden früherer Arbeiten (26).

Um die Zuverlässigkeit der Daten weiterhin abzusichern, wurde versucht, Fehler, die bei der Probengewinnung entstanden sein könnten, systematisch auszuschließen.

Folgende Punkte wurden einer genauen Betrachtung unterzogen:

1. Wäre bei den Tieren der Gruppe I als Folge eines zu kurz

gewählten Ölblocks (siehe Abschnitt Methodik) Flüssigkeit aus weiter distal gelegenen Tubulusabschnitten mitgesammelt worden, hätte die hohe Osmolarität dieser Flüssigkeit, die durch Wasserresorption im Verlauf des distalen Tubulus bedingt ist, durch Beimengung die Osmolarität der fröhdistalen Tubulusprobe erhöht. Dies wäre aber auch von einem Anstieg der Inulinkonzentration bzw. des Quotienten $\frac{TF_{Inulin}}{P_{Inulin}}$ begleitet. Da diese Werte bei den Tieren der Gruppe I sogar niedriger sind als in Gruppe II und eine geringe Streuung der Einzelwerte vorliegt, kann ein derartiger Fehler ausgeschlossen werden.

2. Wäre es beim Sammeln der Flüssigkeitsproben zu einer Erhöhung der Stromrate in der Henleschen Schleife gekommen, so hätte dies wahrscheinlich ebenfalls zu einer Zunahme der fröhdistalen Osmolarität geführt. Ein methodischer Fehler dieser Art hätte sich aber bei den erwachsenen Tieren (stark erniedrigte fröhdistale Osmolarität) stärker ausgewirkt, da hier, bedingt durch den höheren Tubulusradius, die Strömungswiderstände geringer sind.
3. Zur weiteren Absicherung wurden die Punktionsstellen lokalisiert. Es zeigte sich, daß bei den Tieren beider Altersgruppen in den ersten 10% der Länge des distalen Tubulus punktiert worden war. Hätte vom Ende des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife bis zur Punktionsstelle im fröhdistalen Tubulus eine nennenswerte osmotische Äquilibration stattgefunden, wäre eine größere Streubreite der Werte zu erwarten gewesen. Man kann also davon ausgehen, daß die erhobenen Befunde sehr genau die osmotischen Aktivitäten am Ende der Henleschen Schleife dokumentieren.

Diese Befunde berechtigen zu der Annahme, daß die Fähigkeit zur Bildung hypotoner Flüssigkeit in der Henleschen Schleife erst während der postnatalen Entwicklung erlangt wird.

Ausschließlich der aufsteigende Schenkel der Schleife scheint für diese Eigenschaft verantwortlich zu sein, da die Tubulusflüssigkeit am Ende des absteigenden Schenkels im osmotischen Äquilibrium mit dem Interstitium des Nierenmarks steht und sich hier osmotische Aktivitäten bis zum Mehrfachen der Isotonie finden lassen (31).

Der aufsteigende Schenkel besitzt zwei Eigenschaften, die die Bildung hypotoner Flüssigkeit gewährleisten:

1. Niedrige hydraulische Leitfähigkeit (41)
2. Natriumchlorid-Resorption mit aktiven Transportmechanismen im dicken aufsteigenden Teil (11).

Für erwachsene Tiere gelten diese Eigenschaften als erwiesen (11). Ursache der niedrigen osmotischen Verdünnungsfähigkeit der Henleschen Schleife während der Differenzierung könnte demnach entweder in einer hohen hydraulischen Leitfähigkeit oder in einer niedrigen Natriumresorption zu suchen sein.

Durch Untersuchungen am isolierten und in vitro perfundierten dicken aufsteigenden Teil der Schleife konnte gezeigt werden, daß die hydraulischen Leitfähigkeiten für neonatale Tiere (2 - 10 Tage alt) und erwachsene Tiere nahezu identisch sind (36). Veränderungen der Wasserleitfähigkeit während der Ontogenese scheinen somit unwahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur in zwei Proben fröhdistaler Tubulusflüssigkeit neben den Messungen des osmotischen Drucks Messungen der Elektrolytkonzentrationen vorgenommen. Es wurde dabei ein Mikroanalyseverfahren angewendet (52). Die Natrium- und Chloridkonzentrationen waren 131 bzw. 133 mM für die Gruppe der neonatalen Tiere und 61 bzw. 71 mM für die Gruppe der erwachsenen Tiere. Eine Erniedrigung der Natrium- und Chloridkonzentrationen in der Gruppe der erwachsenen Tiere weist eindeutig auf eine Zunahme der Natriumchloridresorption während der Ontogenese hin.

Dies konnte ebenfalls durch Daten bestätigt werden, die am isolierten und in vitro perfundierten dicken aufsteigenden Teil der Schleife gewonnen wurden. Es zeigte sich, daß der Natrium- und Chloridtransport während der Entwicklung um das 5-fache ansteigt. Der maximale Konzentrationsgradient für Natrium zwischen Tubuluslumen und Interstitium lag bei 75 meq/l für erwachsene und bei 40 meq/l für neonatale Tiere (36). Die zunehmende osmotische Verdünnungsfähigkeit der Henleschen Schleife ist demnach durch die Entwicklung der anisotonen Natriumchloridresorption in ihrem dicken aufsteigenden Teil bedingt.

Messungen der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -stimulierbaren ATPase - einem Enzym, dessen Existenz eng mit dem aktiven Transport dieser Ionen gekoppelt ist - zeigen in einzelnen dicken aufsteigenden Schleifensegmenten (35, 36) eine niedrigere Aktivität (bezogen auf Trockengewicht und Länge) während der Differenzierung. Dies läßt den Schluß zu, daß es im Verlauf der postnatalen Entwicklung zu einer Zunahme der Transportstellen kommt.

Damit scheint die Entwicklung der medullären Gegenstromfunktionen der Niere eng an die postnatale Differenzierung der Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife gekoppelt zu sein. Änderungen der Mikroarchitektur der Niere (z.B. zunehmende Schleifenlängen des superfiziellen Nephrons) und entwicklungsbedingte Veränderungen der hydraulischen Leitfähigkeit des Sammelrohres (35) scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf der postnatalen Ontogenese der Niere findet eine Zunahme der maximalen osmotischen Endharnkonzentrierung statt. Als wesentliche Ursache dafür ist ein Anstieg des osmotischen Druckes im Nierenmark während dieser Zeit anzusehen. Für seine Bereitstellung ist die osmotische Arbeit der Henleschen Schleife mitbestimmend.

In der vorliegenden Arbeit wurde die postnatale Funktionsentwicklung der Henleschen Schleife an superfiziellen Nephronen der Rattenniere mit Methoden der Mikropunktion und Mikrodissektion untersucht. Die Tiere wurden salzreich ernährt und stammten aus zwei verschiedenen Altersgruppen.

Gruppe I: Tiere während der frühen postnatalen Entwicklung
(Alter 12 - 15 Tage, n = 11)

Gruppe II: Tiere während der späten postnatalen Entwicklung
(Alter 27 - 35 Tage, n = 4).

Während der Entnahme von intratubulärer Flüssigkeit wurden die glomeruläre Filtrationsrate, die Natriumresorption, die osmotische Aktivität des Endharns sowie der arterielle Blutdruck des Tieres gemessen. Die Filtrationsraten des einzelnen Glomerulum wurden aus den Tubulusflüssigkeiten beider Punktionsstellen (Beginn und Ende der Henleschen Schleife) bestimmt. Sie sind für das gleiche Nephron bei beiden Altersgruppen identisch und zeigen eine Zunahme innerhalb des untersuchten Entwicklungsabschnittes von 6.07 ± 0.85 auf 11.37 ± 1.48 nl/min. Die fraktionelle Flüssigkeitsresorption im proximalen Konvolut nimmt von $34.1 \pm 14.6\%$ auf $47.2 \pm 3.8\%$ ebenso wie diejenige der gesamten Henleschen Schleife (Gruppe I: $38.1 \pm 6.9\%$; Gruppe II: $49.8 \pm 4.8\%$) zu. Hier vervielfacht sich die absolute Flüssigkeitsresorption um das 2.5-fache und der Flüssigkeits-einstrom in die Henlesche Schleife steigert sich von 4.33 ± 1.12 auf 7.14 ± 0.65 nl/min. Dies zeigt, daß die Flüssigkeitsresorption in der Henleschen Schleife disproportional zum Anstieg des Volumeneinstroms zunimmt. Die Osmolarität der Tubu-

lusflüssigkeit am Ende der Henleschen Schleife fällt von 284 ± 19.8 auf 180 ± 18.2 mosmol/l ab. Das Ende der Henleschen Schleife wurde durch Mikrodissektion der punktierten Nephrone als derjenige Ort definiert, der im Mittel in den ersten 8.8% der distalen Tubuluslänge lag.

Diese Befunde beweisen, daß die Fähigkeit zur Bildung hypotoner Flüssigkeit in der Henleschen Schleife erst im Verlauf der postnatalen Entwicklung erworben wird. Die Zunahme der osmotischen Arbeit der Henleschen Schleife ist eine wesentliche Voraussetzung für den Aufbau eines osmotischen Druckgradienten im Nierenmark.

6. Literatur

- 1) Adolph, E.F.:
Postnatal development of water diuresis.
Am. J. Physiol. 133: 191-196, 1941
- 2) Alexander, P.D., und D.A. Nixon:
The foetal kidney.
Brit. med. Bull. 17: 2, 1961
- 3) Alexander, P.D., D.A. Nixon, W.F. Widdas und F.X. Wohlzogen:
Renal function in the sheep foetus.
J. Physiol. 140: 40-48, 1958
- 4) Alexander, P.D., D.A. Nixon, W.F. Widdas und F.X. Wohlzogen:
Gestational variations in the composition of the foetal fluids and foetal urine in the sheep.
J. Physiol. 140: 1-13, 1958
- 5) Aperia, A., O. Broberger, K. Thodenius und R. Zetterström:
Development study of the renal response to an oral salt load in preterm infants.
Acta Ped. Scand. 63: 517-524, 1974
- 6) Aperia, A., und P. Herin:
Development of glomerular perfusion rate and nephron filtration rate in rats 17 - 60 days old.
Am. J. Physiol. 228: 1319-1325, 1975
- 7) Aschinberg, L.C., D.I. Goldsmith, H. Olbing, A. Spitzer, C.M. Edelmann und M.D. Blafox:
Neonatal changes in renal blood flow distribution in puppies.
Am. J. Physiol. 228: 1453-1461, 1975
- 8) Barnes, R.S., R.S. Cornline und M. Silver:
Foetal urine production in the sheep.
J. Physiol. 233: 14-21, 1973
- 9) Behrenbeck, D.W., und H.W. Reinhardt:
Untersuchungen an wachen Hunden über die Einstellung der Na-Bilanz. II. Postprandiale Elektrolyt- und Wasserbilanz bei unterschiedlicher Kochsalzzufuhr.
Pflügers Arch. 255: 280-288, 1967
- 10) Boylan, J.W., E.P. Colburn und R.A. McCance:
Renal function in the foetus and newborn guinea pig.
J. Physiol. 141: 323-330, 1958
- 11) Burg, M.B., und N. Green:
Function of the thick ascending limb of Henle's loop.
Am. J. Physiol. 224: 659-668, 1973

- 12) Burke, T.J., L.G. Navar, J.R. Clapp und R.R. Robinson:
Response of single nephron glomerular filtration rate to
distal nephron microperfusion.
Kidney Intern. 6: 230-240, 1974
- 13) Capek, K., H. Dlouha, J. Fernandez und M. Popp:
Regulation of proximal tubular reabsorption in early
postnatal period of infant rats. Micropuncture study
(Abstract).
Intern. Congr. Physiol. Washington 1968
- 14) Davis, J.M., J. Schnermann und M. Horster:
Micropuncture method for the determination of nephron
filtration rate. A recollection study.
Pfluegers Arch. 333: 271-280, 1972
- 15) Dev, B., C. Drescher und J. Schnermann:
Resetting of tubuloglomerular feedback sensitivity by
dietary salt intake.
Pfluegers Arch. 364: 263-277, 1974
- 16) Diamond, J.M.:
The mechanism of isotonic water transport.
J. Gen. Physiol. 48: 15, 1964
- 17) Dicker, S.E., und H. Heller:
The mechanism of water diuresis in adult and newborn
guinea-pigs.
J. Physiol. 112: 149-157, 1951
- 18) Edelmann, C.M., jr., H.L. Barnett und V. Troukkou:
Renal concentration mechanism in newborn infants. Effect
of dietary protein and water content, role of urea, and
responsiveness to antidiuretic hormone.
J. Clin. Invest. 39: 1062-1069, 1960
- 19) Eyth, Y., und Y. Gutman:
Ontogenesis of microsomal ATPase in the rabbit kidney.
Biochem. Biophys. Acta 91: 195, 1969
- 20) Falk, G.:
Maturation of renal function in infant rats.
Am. J. Physiol. 181: 157-164, 1955
- 21) Fetterman, G.H., N.A. Shuplock, F. Phillip und H.S. Gregg:
The growth and maturation of human glomeruli and proximal
convolutions from term to adulthood. Studies by micro-
dissection.
Pediat. 35: 601, 1965

- 22) Forrest, I.N., jr., und M.W. Stanier:
Kidney composition and renal concentration ability in
young rabbits.
J. Physiol. 187: 4, 1966
- 23) Gersch, J.:
The correlation of structure and function in the developing
meso- and metanephrons.
Carnegie Inst. Washington, Contrib. Embryol. 26: 33, 1937
- 24) Grantham, J.J., M.B. Burg und J. Orloff:
The nature of transtubular Na and K transport in isolated
rabbit renal collecting tubules.
J. Clin. Invest. 49: 1815-1823, 1970
- 25) Grantham, J.:
Mode of water transport in mammalian renal collecting tubules.
Feder. Proc. 30: 14-21, 1971
- 26) Gottschalk, C.W., und M. Mylle:
Micropuncture study of the mammalian urinary concentration
mechanism: evidence for the countercurrent hypothesis.
Am. J. Physiol. 196: 927-936, 1959
- 27) Heiler, H.:
Effects of dehydration on adult and newborn rats.
J. Physiol. 108: 303-308, 1949
- 28) Heller, H., und E.J. Zeims:
The antidiuretic and oxytocic hormones in the posterior
pituitary glands of newborn infants and adults.
J. Physiol. 109: 141-148, 1953
- 29) Hendrik, A., und F.H. Epstein:
Effect of feeding protein and urea on renal concentrating
ability in the rat.
Am. J. Physiol. 195: 539-542, 1958
- 30) Hierholzer, K., R. Müller-Suur, H.-U. Gutsche, M. Butz und
J. Lichtenstein:
Filtration in surface glomeruli as regulated by flow rate
through the loop of Henle.
Pfluegers Arch. 352: 315-337, 1974
- 31) Horster, M., und K. Thureau:
Micropuncture studies on the filtration rate of single
superficial and juxtamedullary glomeruli in the rat kidney.
Pfluegers Arch. 301: 162-181, 1968
- 32) Horster, M., und H. Valtin:
Postnatal development of renal function: micropuncture and
clearance studies in the dog.
J. Clin. Invest. 50: 779-795, 1971

- 33) Horster, M.:
Die postnatale Entwicklung des renalen Volumentransports.
Habilitationsschrift. München: University press 1973,
S. 1-103
- 34) Horster, M., und L. Larsson:
Mechanisms of fluid absorption during proximal tubule
development.
Kidney Intern. 10: 348-363, 1976
- 35) Horster, M.:
Principles of nephron differentiation.
Am. J. Physiol. 253: F387-393, 1978
- 36) Horster, M.:
Loop of Henle functional differentiation: in vitro per-
fusion of the isolated thick ascending segment.
Pfluegers Arch. 378: 15-24, 1978
- 37) Jamison, R.I., C.M. Benett und R.W. Berliner:
Countercurrent multiplication by the thin loop of Henle.
Am. J. Physiol. 212: 357-366, 1967
- 38) Kaufman, J.S., R.J. Hamburger und W. Flamenbaum:
Tubuloglomerular feedback: effect of dietary NaCl intake.
Am. J. Physiol. 231: 1744-1749, 1976
- 39) Kleinmann, L.I., und J.H. Reuter:
Renal response of the newborn dog to saline load: the role
of intrarenal blood flow distribution.
J. Physiol. 239: 225-236, 1974
- 40) Klümper, J.D., K.J. Ullrich und H.H. Hilger:
Das Verhalten des Harnstoffs in den Sammelrohren der Säuge-
tierniere.
Pfluegers Arch. 267: 238, 1955
- 41) Kokko, J.P., and F.C. Rector, jr.:
Countercurrent multiplication system without active trans-
port in inner medulla.
Kidney Intern. 2: 214-223, 1972
- 42) Kriz, W.:
Der architektonische und funktionelle Aufbau der Niere.
Z. Zellforsch. 82: 459, 1967
- 43) Larsson, L., und M. Horster:
Ultrastructure and net fluid transport in isolated perfused
developing proximal tubules.
J. Ultrastruct. Res. 54: 276-285, 1976

- 44) Maddox, D.A., J. Troy und B.M. Brenner:
Autoregulation of filtration rate in the absence of macula
densa glomerular feedback.
Am. J. Physiol. 227: 123-131, 1974
- 45) Martinek, J., M. Janovsky, V. Stanincova und R. Slechtova:
The effect of vasopressin on the water diuresis and ex-
cretion of Na, Cl, K. and urea in infants.
Nephron 1: 322, 1964
- 46) Morgan, T., and R.W. Berliner:
Permeability of the loop of Henle, vasa recta, and collecting
duct to water urea and sodium.
Am. J. Physiol. 215: 108-115, 1968
- 47) Osathanondh, V., und E.L. Potter:
Development of human kidney as shown by microdissection:
Formation and interrelationship of collecting tubules and
nephrons.
Arch. Pathol. 76: 290-302,
- 48) Pennell, P.J., F.B. Lacy und R.L. Jamison:
An in vivo study of the concentrating process in the
descending limb of Henle's loop.
Kidney Intern. 5: 337-347, 1974
- 49) Peter, K.:
Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere.
Gustav Fischer, Jena 1909 und 1927
- 50) Potter, E.L., und S.T. Thierstein:
Glomerular development in the kidney as an index of foetal
maturity.
J. Pediatr. 22: 695, 1943
- 51) Rennick, B., B. Hamilton and R. Evans:
Development of renal tubular transport of TEA and PAH in
the puppy and piglet.
Am. J. Physiol. 201: 743-752, 1961
- 52) Rick, R., M. Horster, A. Dörge und K. Thureau:
Determination of electrolytes in small biological fluid
samples using energy dispersive x-ray microanalysis.
Pfluegers Arch. 369: 95-98, 1977
- 53) Rocha, A.S., und J.P. Kokko:
Permeability of medullary nephron segments to urea and
water: Effect of vasopressin.
Kidney Intern. 6: 379-387, 1974
- 54) Rocha, A.S., und J.P. Kokko:
Sodium chloride and water transport in the medullary thick
ascending limb of Henle. Evidence for active chloride
transport.
J. Clin. Invest. 52: 612-623, 1973

- 55) Schmidt, U., M. Horster und U. Schmid:
In vitro effect of aldosterone on Na-K-ATPase activity in
microdissected rabbit renal tubule (Abstract).
Z. Physiol. Chem. (im Druck)
- 56) Schmidt, U., und M. Horster:
Na-K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron
segments dissected in vitro.
Am. J. Physiol. 233: F55-F60, 1977
- 57) Schnermann, J., M. Horster und D.Z. Levine:
The influence of sampling technique on the micropuncture
determination of GFR and reabsorptive characteristics of
single rat proximal tubules.
Pfluegers Arch., Eur. J. Physiol. 309: 48-58, 1969
- 58) Schnermann, J., F.S. Wright, J.M. Davis, W. Stackelberg und
G. Grill:
Regulation of superficial nephron filtration rate by tubulo-
glomerular feedback.
Pfluegers Arch. 318: 147-175, 1970
- 59) Schnermann, J., A.E.G. Persson und B. Agerup:
Tubuloglomerular feedback.
J. Clin. Invest. 52: 862-869, 1973
- 60) Schnermann, J.:
Regulation of single nephron filtration rate by feedback:
facts and theories.
Clin. Nephrol. 1: 75-81, 1975
- 61) Schwartz, M.M., und M.A. Venkatachalam:
Structural differences in thin limbs of Henle: Physiological
implications.
Kidney Intern. 6: 193-208, 1974
- 62) Spitzer, A., und M. Brandis:
Functional morphological maturation of the superficial
nephrons: relationship to total kidney function.
J. Clin. Invest. 53: 279-287, 1974
- 63) Stanier, M.W.:
Development of intrarenal solute gradients in foetal and
postnatal life.
Pfluegers Arch. 336: 263-270, 1972
- 64) Thureau, K., und E. Wober:
Zur Lokalisation der autoregulativen Widerstandsänderung in
der Niere.
Pfluegers Arch. 274: 553, 1962

- 65) Thurau, K., und J. Schnermann:
Die Natriumkonzentration an den Macula densa-Zellen als
regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin. Wschr. 43: 410, 1965
- 66) Trimble, M.E.:
Renal response to solute loading in infant rats: relation
to anatomical development.
Am. J. Physiol. 219: 1089-1097, 1970
- 67) Weber, W.A., und J. Blackburn:
The permeability of the immature glomerulus to large
molecules.
Lab. Invest. 23: 1, 1970
- 68) Wright, F.S., und G. Giebisch:
Glomerular filtration in single nephrons.
Kidney Intern. 1: 201-209, 1972
- 69) Yunibhaud, P., und U. Held:
Nieren und Urinosmolarität nach der Geburt bei der Ratte
unter Flüssigkeitsentzug.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 23: 91-96, 1965
- 70) Zink, H., und M. Horster:
Function of the loop of Henle during development. Studies
by micropuncture on superficial nephrons. (Abstract).
45. Tagung, Deutsche Physiol. Gesellschaft, Wien 1975
- 71) Zink, H., und M. Horster:
Maturation of diluting capacity in Henle's loop of rat
superficial nephrons.
Am. J. Physiol. 233: F519-F524, 1977

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Horster für die Überlassung des Themas und für die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen und Literaturarbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Fräulein Hohlfeld für Ihre Assistenz bei den analytischen Arbeiten sowie bei Fräulein Jenke für die Maschinenschrift der Dissertationsarbeit.

Lebenslauf

Ich, Johann Ludwig Zink, wurde am 25. Februar 1952 in Straubing als Sohn des Polizeibeamten Ludwig Zink und dessen Ehefrau Johanna Zink, geb. Feigl, geboren.

Abitur am Ludwigs-Gymnasium Straubing (naturwissenschaftlicher-mathematischer Zweig) im Mai 1971;
Studium der Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München seit dem Wintersemester 1971/72; Physikum (nach BOA) nach dem Sommersemester 1973; seit 2.1.1974 als Doktorand am Physiologischen Institut der Universität München (Lehrstuhl Prof.Dr. Thurau); Internatsjahr im Wintersemester 1976/77 und im Sommersemester 1977 in München (Wahlfach: Augenheilkunde); Staatsexamen 3. Teil (nach A0) in München im September 1977; anschließend Approbation.

Grundwehrdienst als Stabsarzt vom 2.1.1978 bis 30.3.1979 an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München.

Wissenschaftliche Hilfskraft seit dem 1.4.1979 am Physiologischen Institut der Universität München (Lehrstuhl Prof.Dr. Thurau).

Verheiratet seit dem 21.5.1976 (1 Sohn)

